

第四节层析技术与保健食品功能因子的纯化

层析分离法

- 概述
- 特点：
 - (1) 纯化倍数高
 - (2) 操作规模小，放大困难
 - (3) 终产品纯化
 - (4) 适用于价格昂贵的产品



层析分离法

■ 第一讲 层析分离分类（1）

- 按溶质分子与固定相相互作用机理
- 吸附层析（范德华力，氢键，静电力，共价力）
- 分配层析（溶质在两液相间分配系数不同）
- 凝胶过滤（分子大小与形状）
- 实验技术分类
- 低压（小于0.5 Mpa）
- 中压（0.5-5 Mpa）
- 高压（5-10 Mpa）



层析分离法

■ 第一讲 层析分离分类 (2)

■ 根据固定相形状分类

- 柱层析

- 纸层析

- 薄层层析

■ 根据流动相分类

- 气相层析

- 液相层析

- 超临界流体层析

■ 按操作方式分类

- 迎头法 (frontal analysis)

- 顶替法 (displacement analysis)



层析分离法

■ 第一讲

基本概念

(1) 分配系数 溶质在固定相与流动相浓度比值

(2) 解离常数 吸附质浓度与吸附剂浓度乘积与吸

附复合物浓度比值

(3) 分离因素 某一瞬间被吸附溶质量占总量的分数

(4) 阻滞因子 分配层析溶质移动速度与理想流动

相移动速度（距离）比

值

(5) 溶出体积 在柱色层分离中，使溶质从柱中溶



层析分离法

第一讲

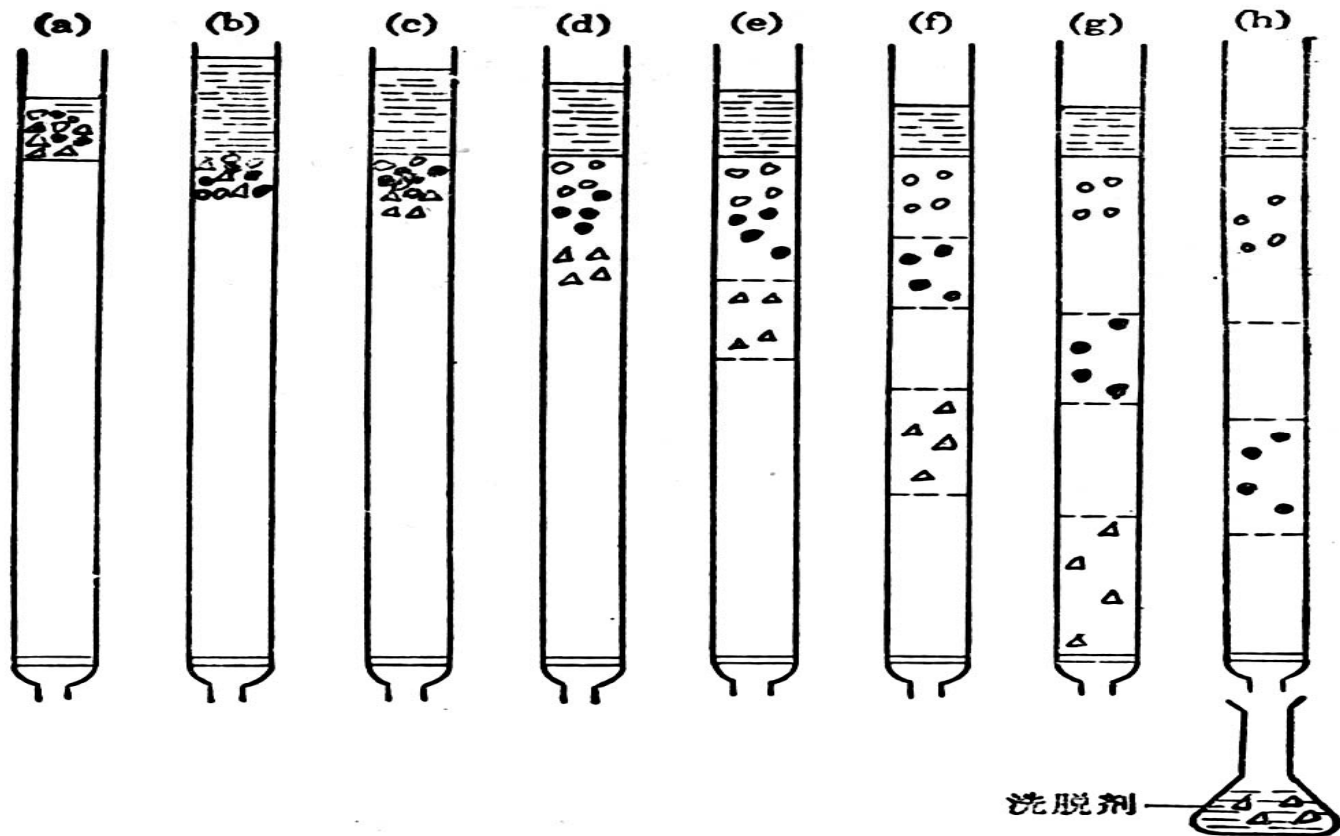


图 22-1 色层分离法的基础

层析分离法

■ 第一讲

分配系数

- $K_d = C_1/C_2$
- K_d 为分配系数
- C_1, C_2 为两液相中的溶质浓度。
- 应用条件：温度一定
- 低浓度



层析分离法

■ 第一讲

分离度

$$m_t = m + q$$

$$C_t = C + q$$

解离常数 K_p :

$$k_p = \frac{mC}{q}$$

$$\alpha = \frac{q}{C_t}$$

分离因数 α 定义为某一瞬间被吸附的溶质量占总量的分数

$$K_p = \frac{(m_t - C_t \alpha)(C_t - C_t \alpha)}{C_t \alpha} = \frac{(m_t - C_t \alpha)(1 - \alpha)}{\alpha} \quad (22-7)$$

层析分离法

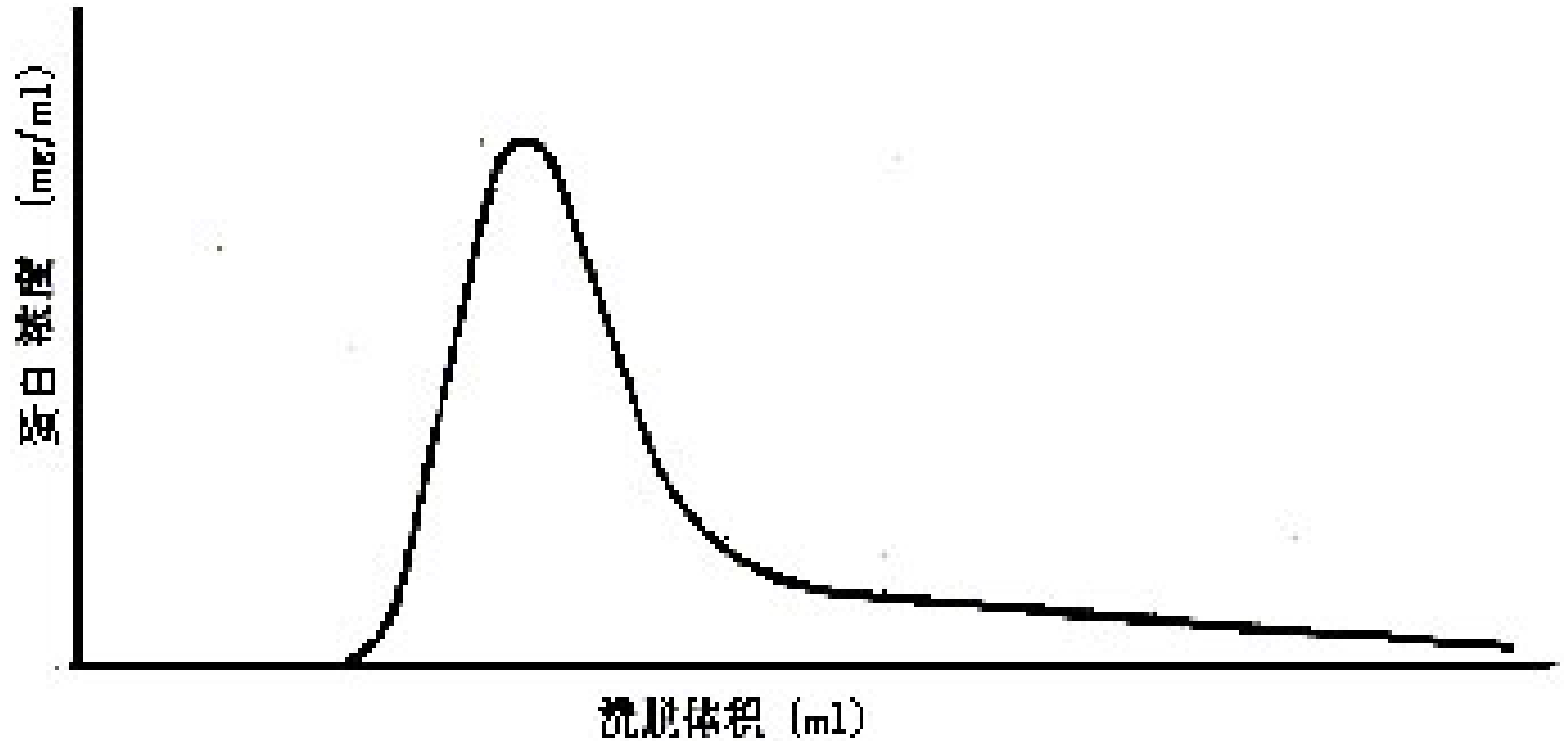


图 22-3 恒定缓冲液条件下，兔醛结合酶的洗脱曲线

层析分离法

■ 第一讲

$$R_f = \frac{\text{溶质的移动速度}}{\text{流动相在层析系统中的移动速度}}$$
$$= \frac{\text{溶质的移动距离}}{\text{在同一时间内溶剂 (前缘) 的移动距离}}$$

$$\text{溶质移动距离} = \frac{V}{\text{能进行分配的有效截面 积}}$$
$$= \frac{V}{A_m + K_d A_s}$$

$$R_f = \frac{A_m}{A_m + K_d A_s}$$



层析分离法

■ 第一讲 洗脱容积

溶质移动速度为 $\frac{V}{t(A_m + K_d A_s)}$

溶质流出层析柱所需时间为 $\frac{L(A_m + K_d A_s)}{V/t}$

流动相体积 $V_e = L(A_m + K_d A_s)$

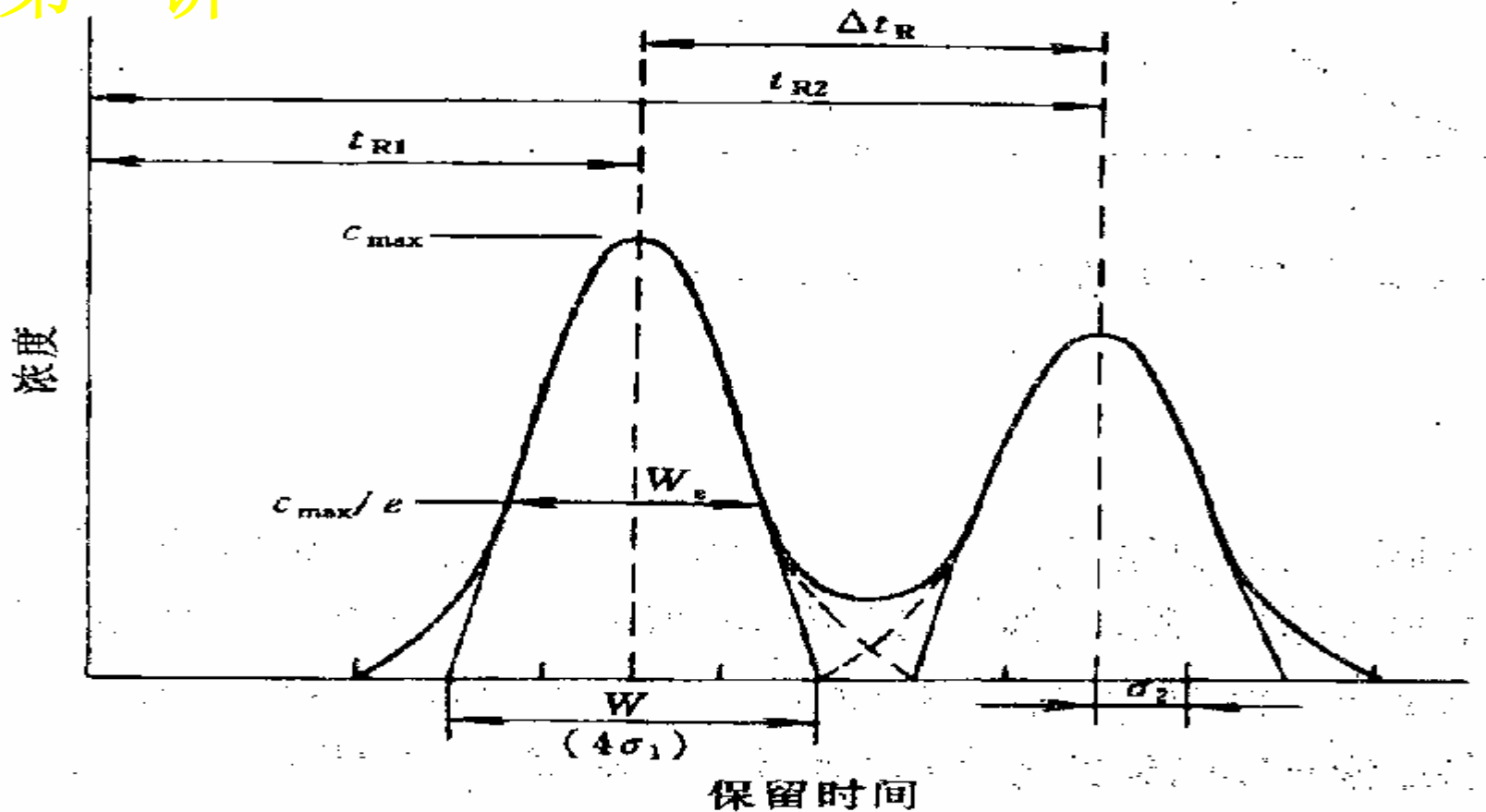
$L A_m = V_m$, 层析柱中流动相体积,

$L A_s = V_s$, 层析柱中固定相体积,

$$V_e = V_m + K_d V_s$$

层析分离法

第一讲



确定分辨率 R_s 的示意图

层析分离法

■ 第一讲

理论塔板

$$f_r = \frac{n!}{r!(n-r)!} \cdot \left(\frac{1}{E+1}\right)^{n-r} \left(\frac{E}{E+1}\right)^r$$

$$E = \frac{\text{流动相中所含溶质的量}}{\text{固定相中所含溶质的量}} = \frac{A_m}{K_d A_s}$$

$$f_r = \frac{1}{\sqrt{2\pi n E / (E+1)^2}} e^{-\frac{(r - n E / (E+1))^2}{2n E / (E+1)^2}}$$

$r = n E / (E+1)$ 时

最大浓度塔板 $r_{\max} = n E / (E+1)$

$r_{\max} = n E / (E+1)$



层析分离法

第一讲

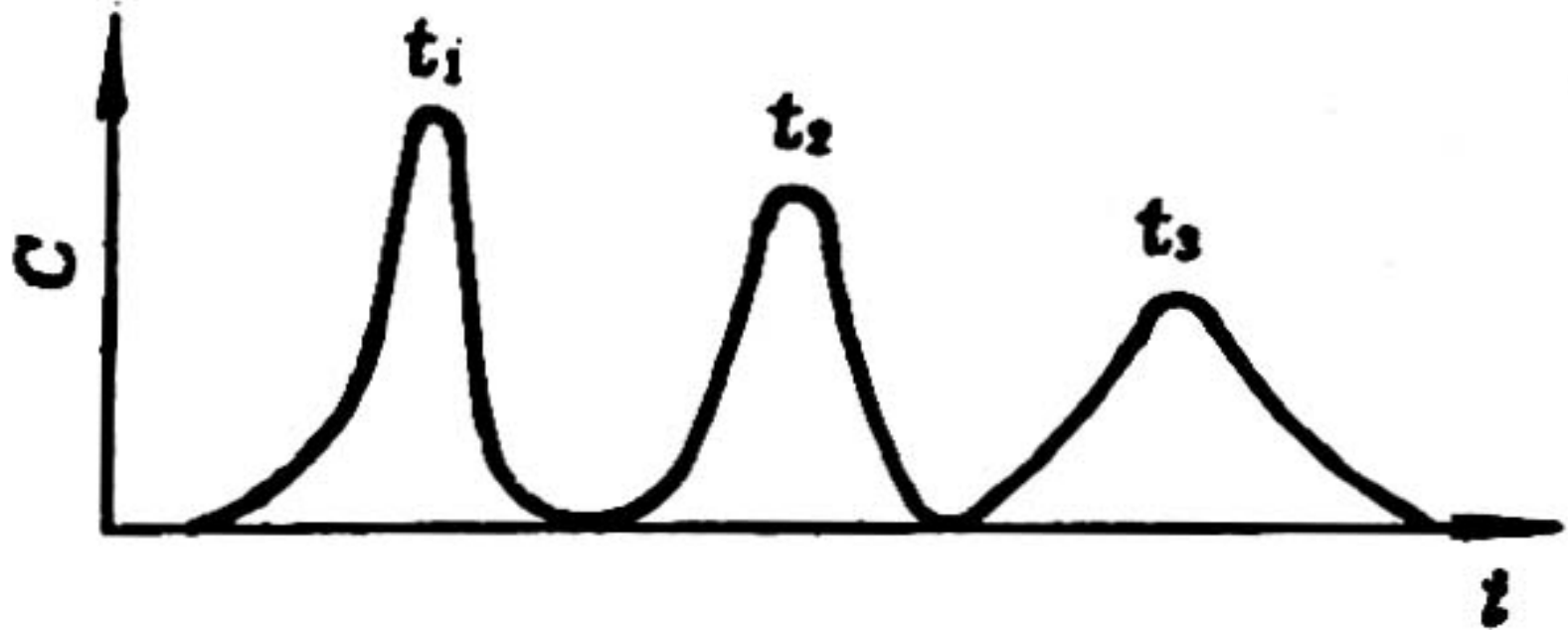


图 22-4 色带的变化过程

C—溶质的浓度； t—时间， $t_1 < t_2 < t_3$

层析分离法

■ 第一讲

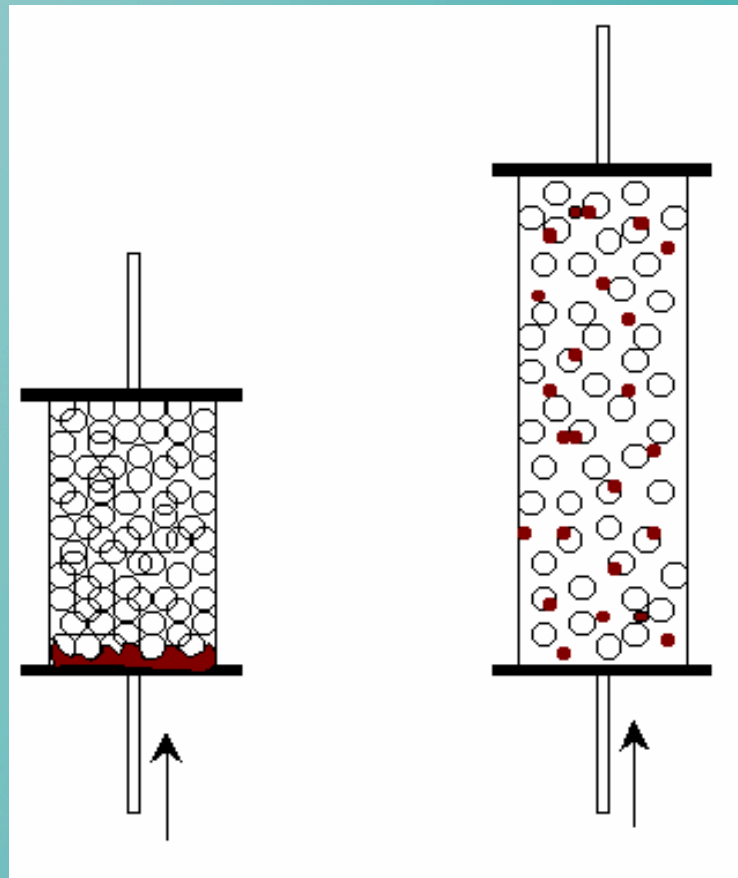
思考题

- 1 想解概念：解离常数，分离因素，阻滞因子，理论塔板高度，洗胶体积，分辨率
- 2 不同的层析分类方法各有何意义？



层析分离法

■ 第二讲 层析分离法（第二讲）



层析分离法

■ 第二讲

层析介质

■ 要求:

- (1) 不溶于流动相
- (2) 化学稳定
- (3) 机械强度
- (4) 大的表面积
- (5) 粒度均匀

■ 层析介质种类

- 无机（氧化铝，硅胶，活性炭）

有机（琼脂糖，纤维素，聚丙烯酰胺）



层析分离法

■ 第二讲 常用层析介质

氧化铝：（活性氧化铝）它是一种多孔性、高分散度固体

- （1）有很大的比表面积，其微孔表面具有吸附性能。
- （2）分子式 Al_2O_3 简单，空间形态复杂，8种以上的形态
- （3）同一形态宏观结构性质如密度、孔隙率、孔径分布、比表面积等存在差异

（4）吸附量与含水量关系很大

制备：由氢氧化铝加热脱水得到的。

吸附基团：铝离子

种类：



层析分离法

第一讲

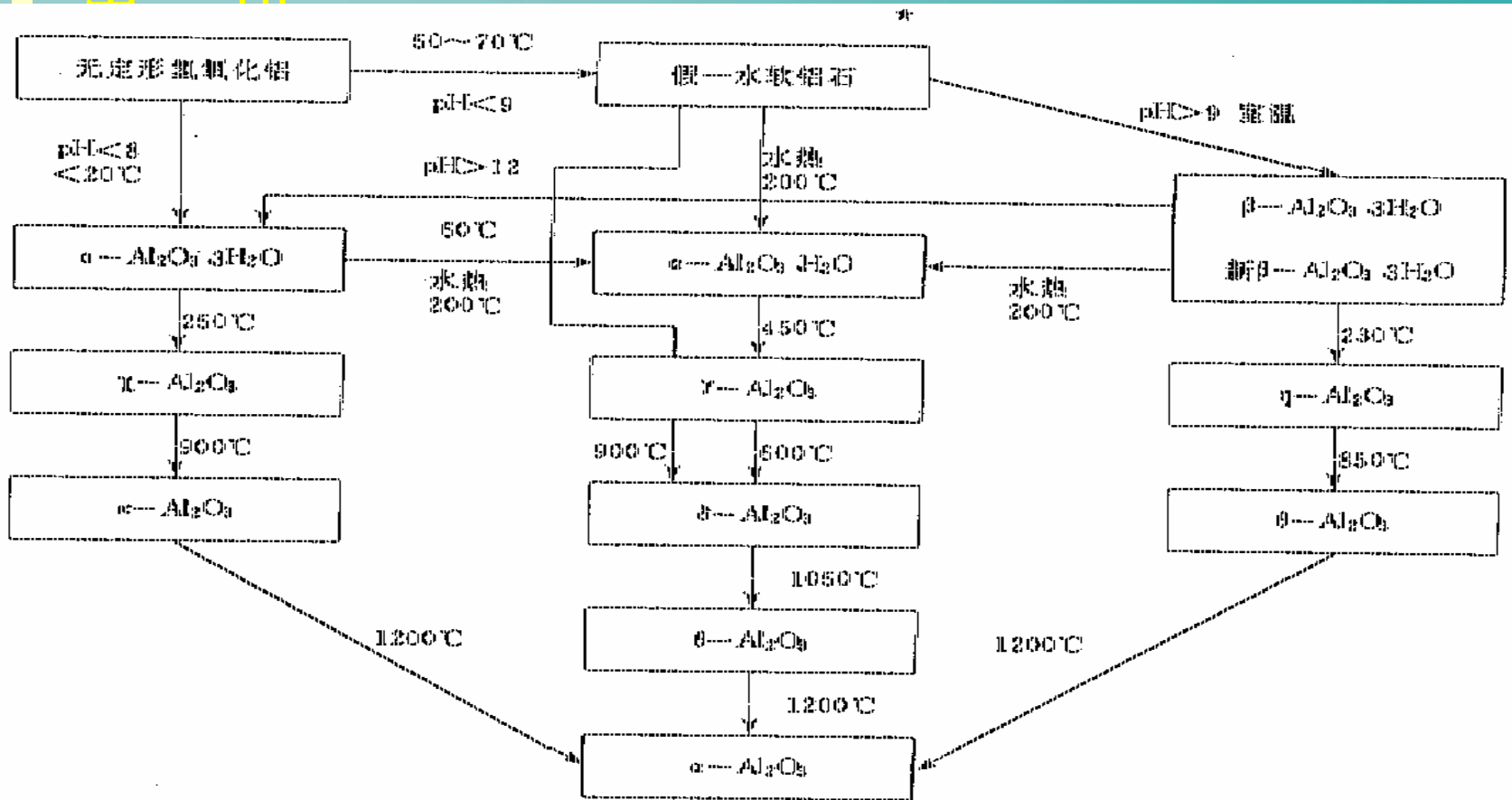


图1 氧化铝的转化过程

层析分离法

■ 第二讲

硅胶

- 硅胶是由多聚硅酸经分子间脱水而形成的一种多孔性物质
- (1) 化学组成 $\text{SiO}_2 \cdot \text{XH}_2\text{O}$,
- (2) 属于无定形结构, 基本结构质点为Si—O四面体, 相互堆积形成硅胶的骨架。质点间的空间即为硅胶的孔隙。
- (3) 硅胶中的水以羟基的形式和硅原子相连而覆盖于硅胶表面。
- **硅胶的分类** (常以孔径大小来分),
 - (1) 特细孔硅胶 (0.8nm以下)。
 - (2) 细孔硅胶 (1.5—2.0nm)
 - (3) 中孔硅胶 (4.0—5.0nm)
 - (4) 粗孔硅胶 (10 nm以上)



层析分离法

■ 第二讲

琼脂糖

- 由海洋生物琼脂提取得到的主要成分
- (1) 中性不带电
- (2) 水溶性线状多糖
- (3) 高亲水性，含大量羟基
- (4) 能制成多孔性凝胶，分离大分子

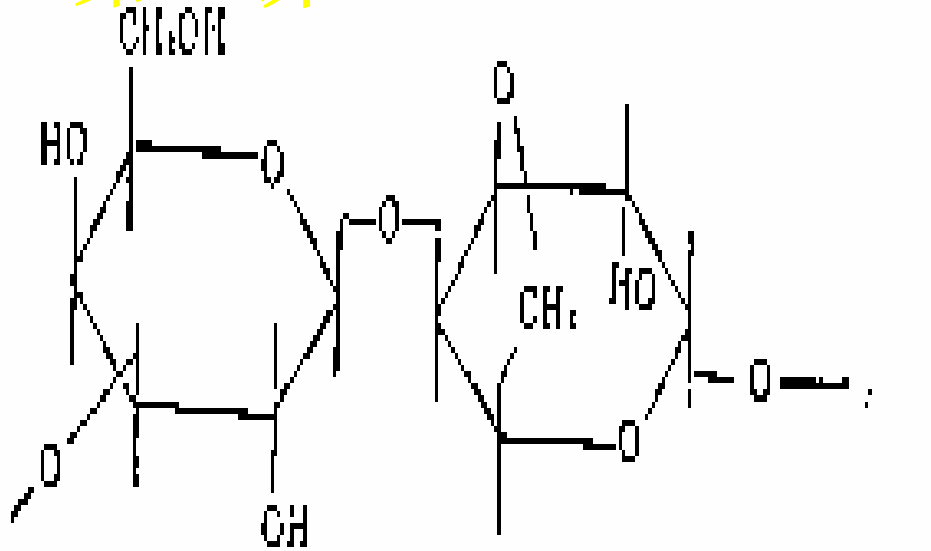
■ 制备:

- (1) 去除带电琼胶成分
- (2) 将溶化的琼脂糖采用悬浮, 乳化或喷珠的方法制

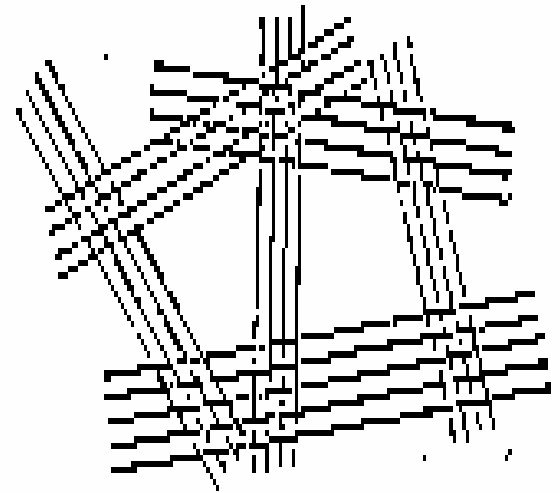


层析分离法

第二讲



(a)



(b)

琼脂糖的基本结构单位和亲水性凝胶结构

a 琼脂糖结构

b 亲水性凝胶结构

层析分离法

■ 第二讲

琼脂糖 (2)

- 介质商品种类
- Sepharose 2B,
- Sepharose 4B,
- Sepharose 6B。
- 经过交联而增加机械强度的琼脂糖
- Sepharose CL-2B,
- Sepharose CL-4B,
- Sepharose CL-6B



层析分离法

■ 第二讲

葡聚糖

- α -1,6 相连的葡萄糖聚合物，由环氧氯丙烷交联得到珠粒
- 性质：
 - (1) 亲水性比琼脂糖高（羟基数多）
 - (2) 化学稳定性及热稳定性好
 - (3) 孔度与机械强度与交联度有关
 - (4) 用于凝胶过滤分子筛
- 应用：水溶液中分离蛋白质等



层析分离法

■ 第二讲

纤维素

- β -1,4 相连的D-葡萄糖（偶而有1,6 键合）
线性天然高聚物
- (1) 亲水
- (2) 微晶与无定型两部分组成，缺乏孔度
- 大孔珠状纤维素
- (1) 高孔度
- (2) 高机械强度
- (3) 亲水性强

■ 应用 离子交换分离蛋白质金属



层析分离法

■ 第二讲

聚丙烯酰胺

性质：

- (1) 丙烯酰胺与交联剂N, N'-甲叉双丙烯酰胺共聚
- (2) 烷烃骨架与酰胺侧链
- (3) 控制交联剂比例可控制网格孔度
- (4) 亲水好，但不如多糖介质
- (5) 机械强度差

应用： (1) 凝胶过滤



层析分离法

■ 第二讲

亲和层析

- **亲和层析** (Affinity Chromatography) 是利用生物体内存在的特异性相互作用的分子对而设计的层析方法。
- **生物体内相互作用的分子对：**
 - (1) 酶—底物或抑制剂
 - (2) 抗原—抗体。
 - (3) 激素—受体。
 - (4) 糖蛋白与凝集素，
 - (5) 生物素—生物素结合蛋白等



层析分离法

■ 第二讲 基质活化方法与配基偶联

- **活化(activation)**: 基质(matrix)上的化学基团是不活泼的, 无法与配基直接偶联, 通过化学反应使介质上化学基团处于活化状态。
 - (1) 大分子配基如蛋白质等可与活化基质直接偶联。
 - (2) 小分子配基, 在基质与配基之间插入若干碳原子手臂(spacer), 然后再与配基偶联。
 - (3) 环氧氯丙烷, 1,4-丁二醇缩水甘油醚本身是活化剂亦具有手臂作用。



层析分离法

■ 第二讲 活化方法 (1)

■ A 溴化氰法

- 溴化氰在碱性条件下与多糖上的羟基反应导入氰酯键或亚氨碳酸酯到基质上, 进而与配基偶联

■ 优点:

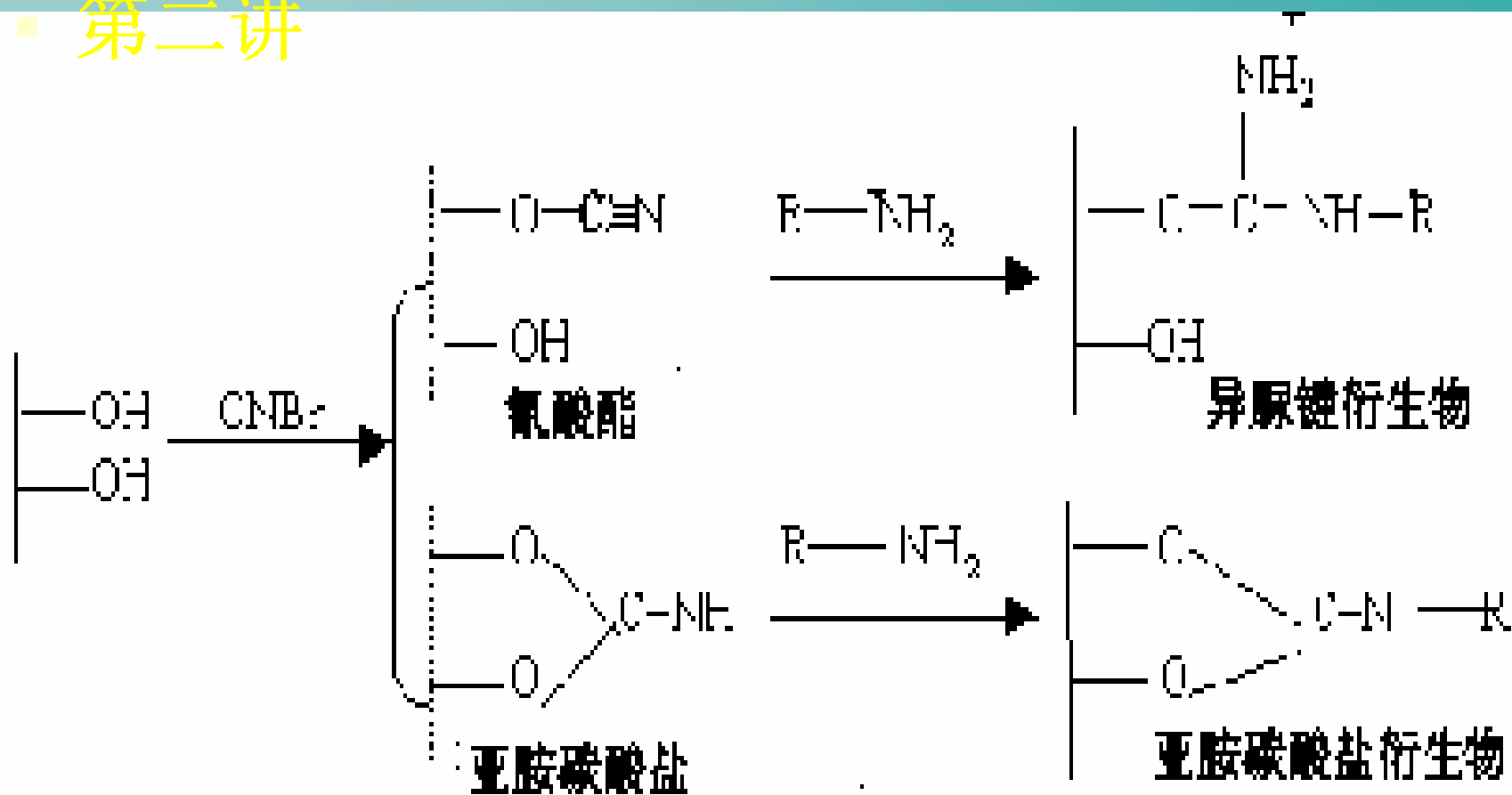
- (1) 适用于含羟基多糖及含羟基的合成基质
- (2) 用于含伯氨基小分子配基及伯氨基大分子配基的偶联
- (3) 操作步骤简单, 重现性好。
- (4) 偶联条件温和, 特别适用于偶联敏感性生物大分子。

■ 缺点:



层析分离法

■ 第二讲



溴化氰活化与配基偶联化学反应式

层析分离法

■ 第二讲

活化方法（2）

■ B 环氧氯丙烷活化

- （1）所形成的共价键稳定, 配基不易落脱

- （2）自动引入手臂,

- （3）有更小的非特异性吸附,

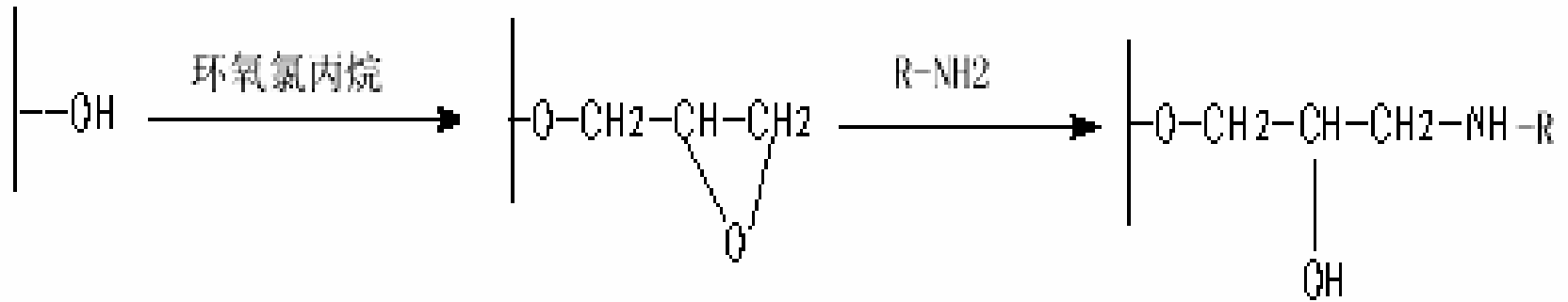
- （4）活化操作简单易行, 危险性相对较小

- **缺点:** 在强碱性条件反应, 不适用于碱敏感物质。



层析分离法

■ 第二讲



环氧氯丙烷活化反应式



层析分离法

■ 第二讲

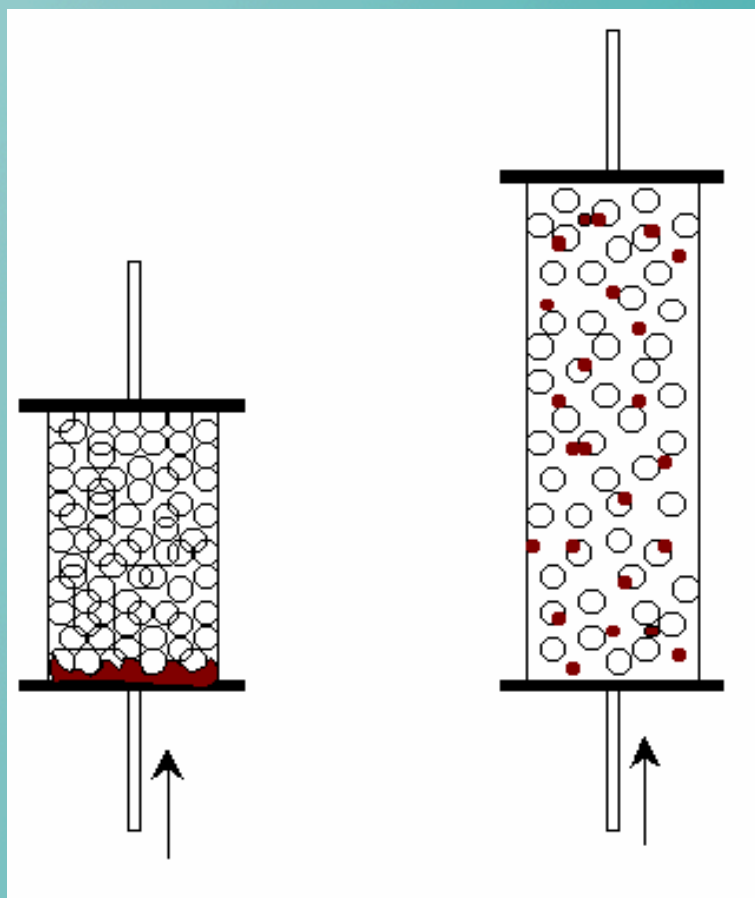
思考题

- 1 常用的层析介质有哪些？各适用于何种状况下的分离？
- 2 亲和层析的机理是什么？



层析分离法

■ 第三讲 层析法（第三讲）



层析分离法

■ 第三讲

活化方法 (3)

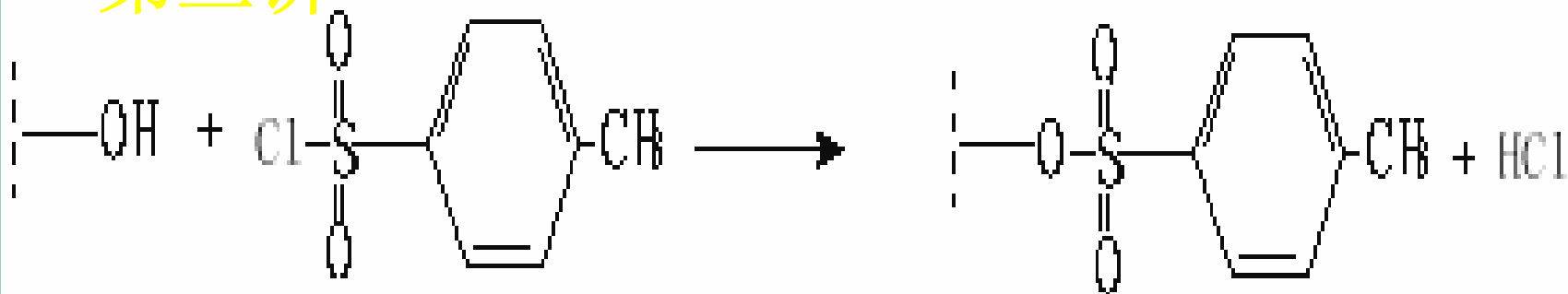
- C 对甲苯磺酰氯活化
- (1) 用于活化含羟基基质, 将羟基转化为磺酰基, 在配基偶联后容易脱落, 不引入电荷。
- (2) 配基与羟基间形成稳定化学键。
- (3) 活化操作需在无水丙酮环境中进行。偶联

配基根据情况, 既可在有机相中



层析分离法

■ 第三讲

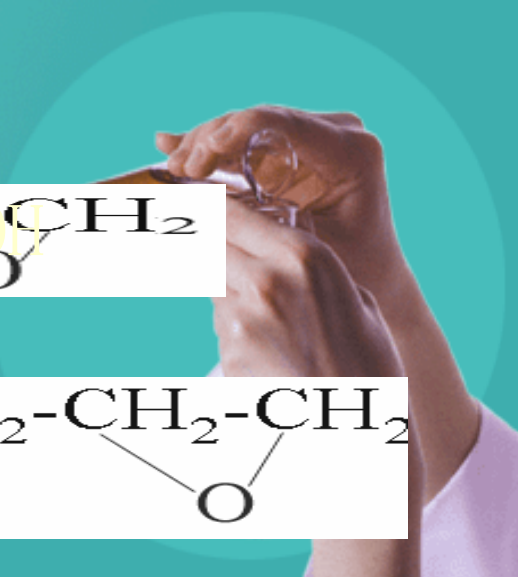
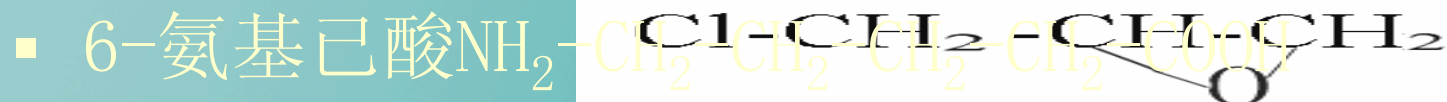
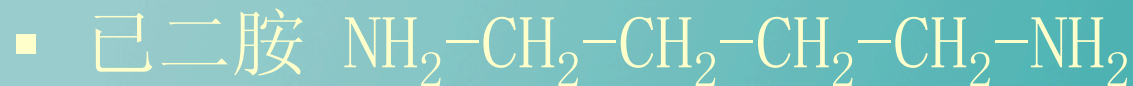
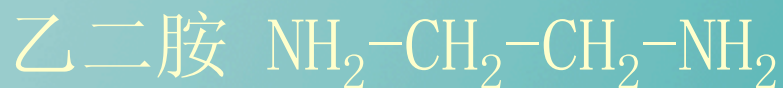


对甲苯磺酰氯活化反应式

层析分离法

■ 第三讲 手臂 (spacer)

- 作用：减少亲和作用空间位阻
- 连接：通过化学反应与活化基团连接
- 手臂化合物：



层析分离法

■ 第三讲 D 残余电荷的掩蔽

目的：防止产生非特异性吸附

原理：通过化学反应消除基团上的电荷

方法：

(1) 自发水解

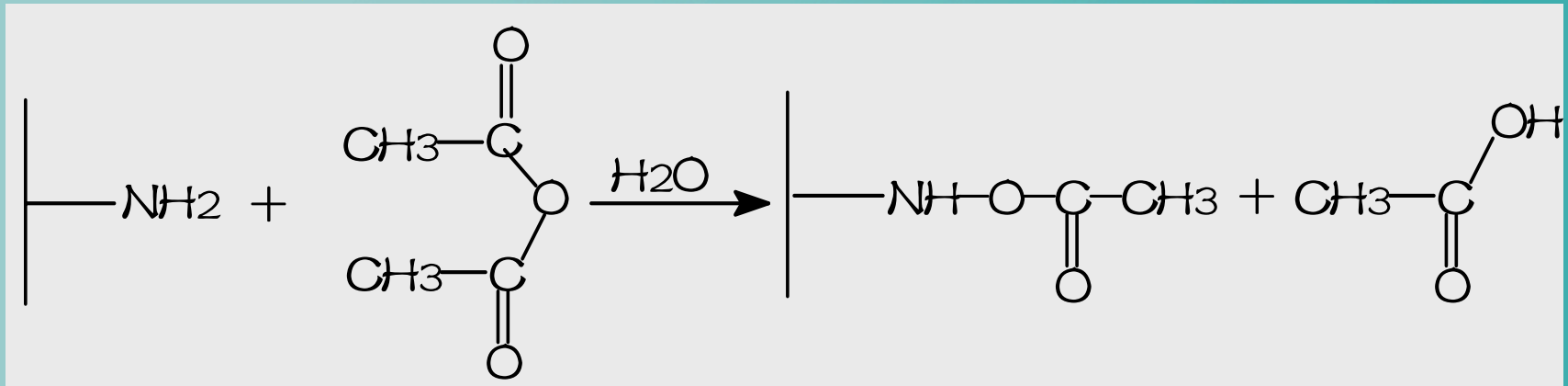
(2) 氨基：醋酸酐

(3) 羧基：水溶性碳二亚胺



层析分离法

■ 第三讲

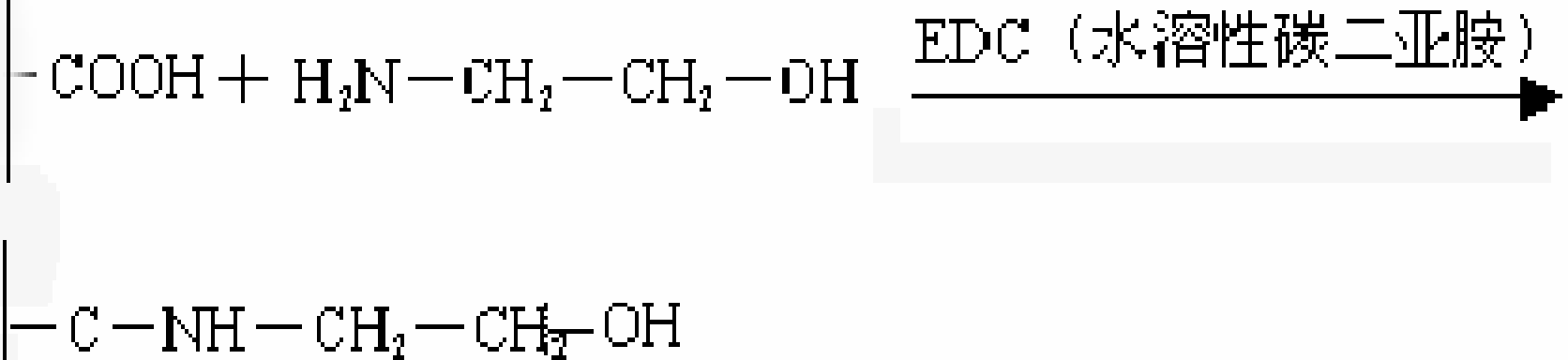


手臂氨末端的掩蔽



层析分离法

第三讲



残留羧基掩蔽反应



层析分离法

■ 第三讲 活化基团与配基密度测定

■ 方法:

- (1) 氨基或羧基可用酸碱滴定。
- (2) 有紫外吸收特征的, 可用紫外分光法测定。
- (3) 通过测定反应余液中配基残留量推算 (偶联率较高的情况)
- (4) 某些情况下需将亲和胶样品分解破坏测定



层析分离法

■ 第三讲 F 亲和介质吸附容量测定

方法:

(1) 流出曲线法: 流出液中目标蛋白浓度达到进

口浓度的90%

(2) Langmiur 吸附等温线法

$$q^* = \frac{q_m \cdot C^*}{K_d + C^*}$$



层析分离法

■ 第三讲

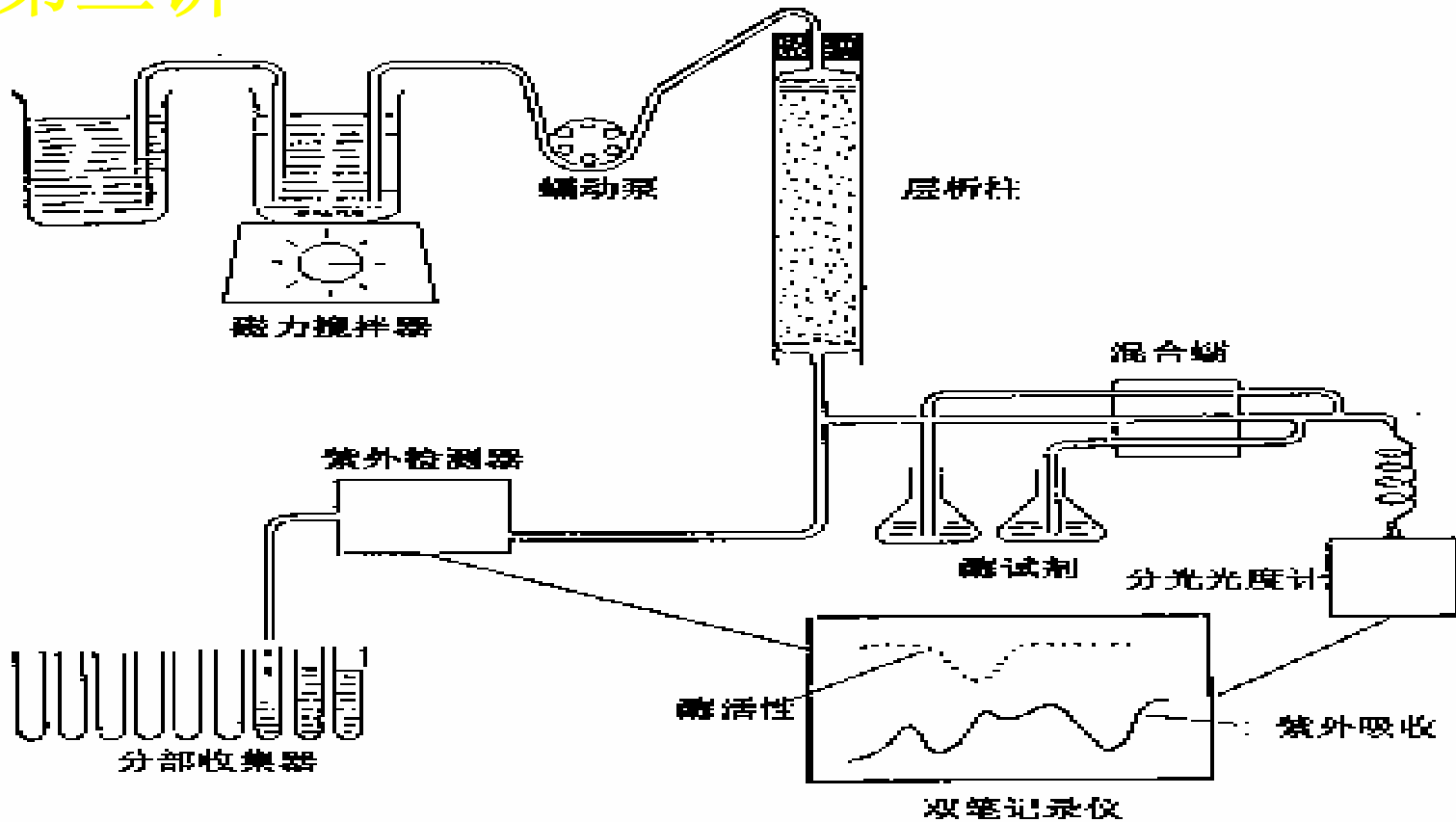
层析装置与操作

- 装置 1 普通 2 高级
- 柱操作
 - (1) 装柱：均匀，无气泡
 - (2) 平衡 (equilibrium)：缓冲液, pH, 盐浓度
 - (3) 上样 (loading)：蛋白浓度, pH, 盐浓度, 缓冲液
 - (4) 洗涤 (washing)：pH, 盐浓度, 洗涤剂, 缓冲液
 - (5) 洗脱 (elution)：条件与吸附相反



层析分离法

■ 第三讲



柱层析分离法的有关装置

层析分离法

■ 第三讲



Pharmacia ÄKTA 层析系统

层析分离法

■ 第三讲

装置

- 泵
- 混合器
- 层析柱
- 检测器
- 记录仪
- 分部收集器



层析分离法

■ 第三讲

装柱

- 调糊：50%
- 一次连续加入悬胶液
- 打开出口阀：层析剂沉降
- 排除空气
- 检查均匀度



层析分离法

■ 第三讲

上样

- 样品处理：
 - (1) 溶解
 - A 调整浓度
 - B 盐
 - C pH
 - (2) 过滤：除去不溶物
- 流速：根据样品浓度与吸附速度而定
- 上样量：80%吸附容量



层析分离法

■ 第三讲

淋洗

- 盐浓度
- pH
- 表面活性剂（0.1-0.5%）
- 淋洗体积：根据流出液杂蛋白浓度而定
- 防止产物丢失又要除去杂质



层析分离法

■ 第三讲

洗脱方法

■ 按操作方式

- a 恒定洗脱 (isocratic elution)

- b 分步洗脱 (stage elution)

- c 梯度洗脱 (gradient elution)

按洗脱机理

专一性洗脱 (specific elution)

非专一性洗脱 (nonspecific elution)

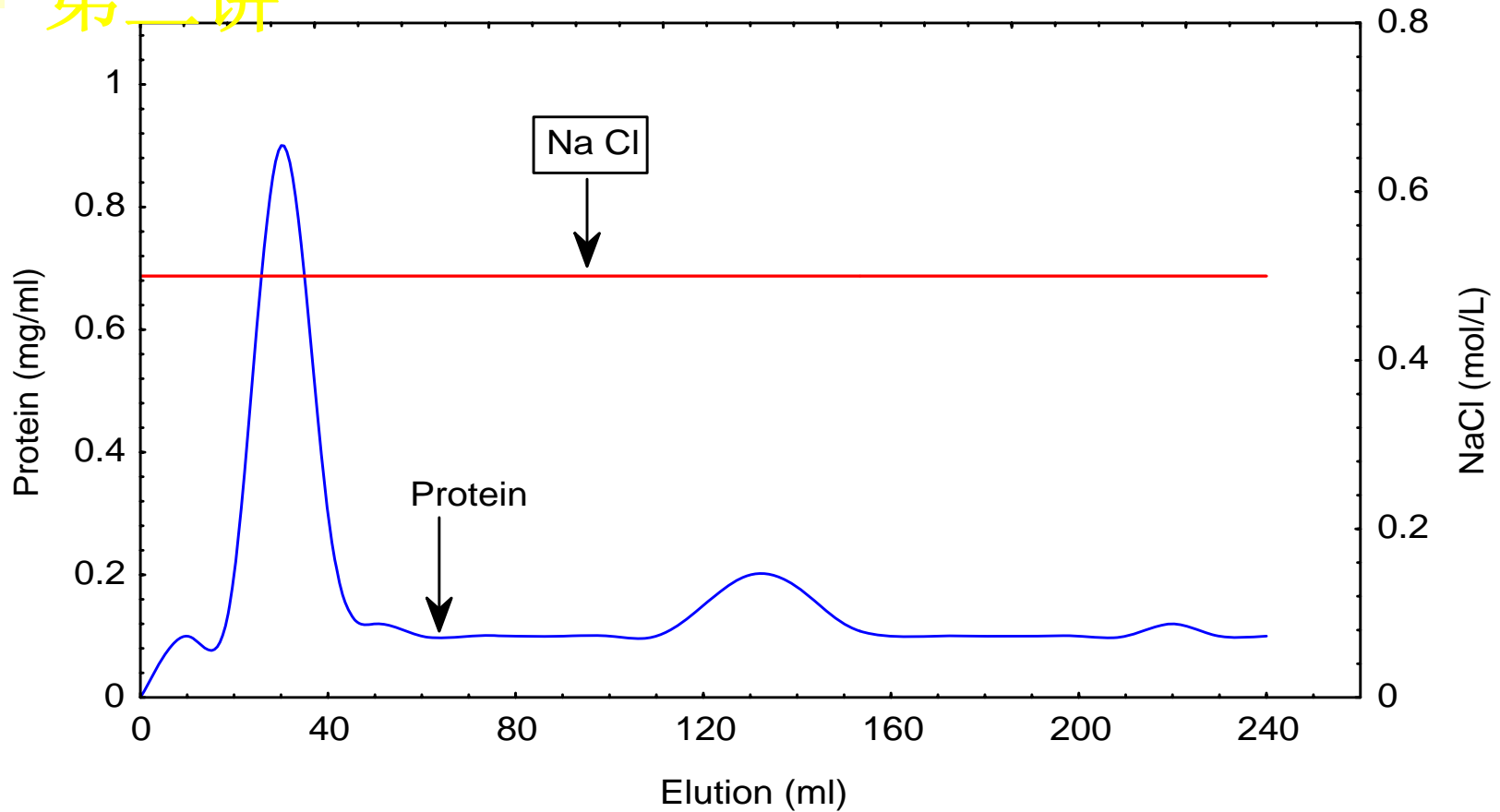
添加剂：乙二醇，NaCNS、脲素、盐酸胍

洗脱体积：5倍床体积



层析分离法

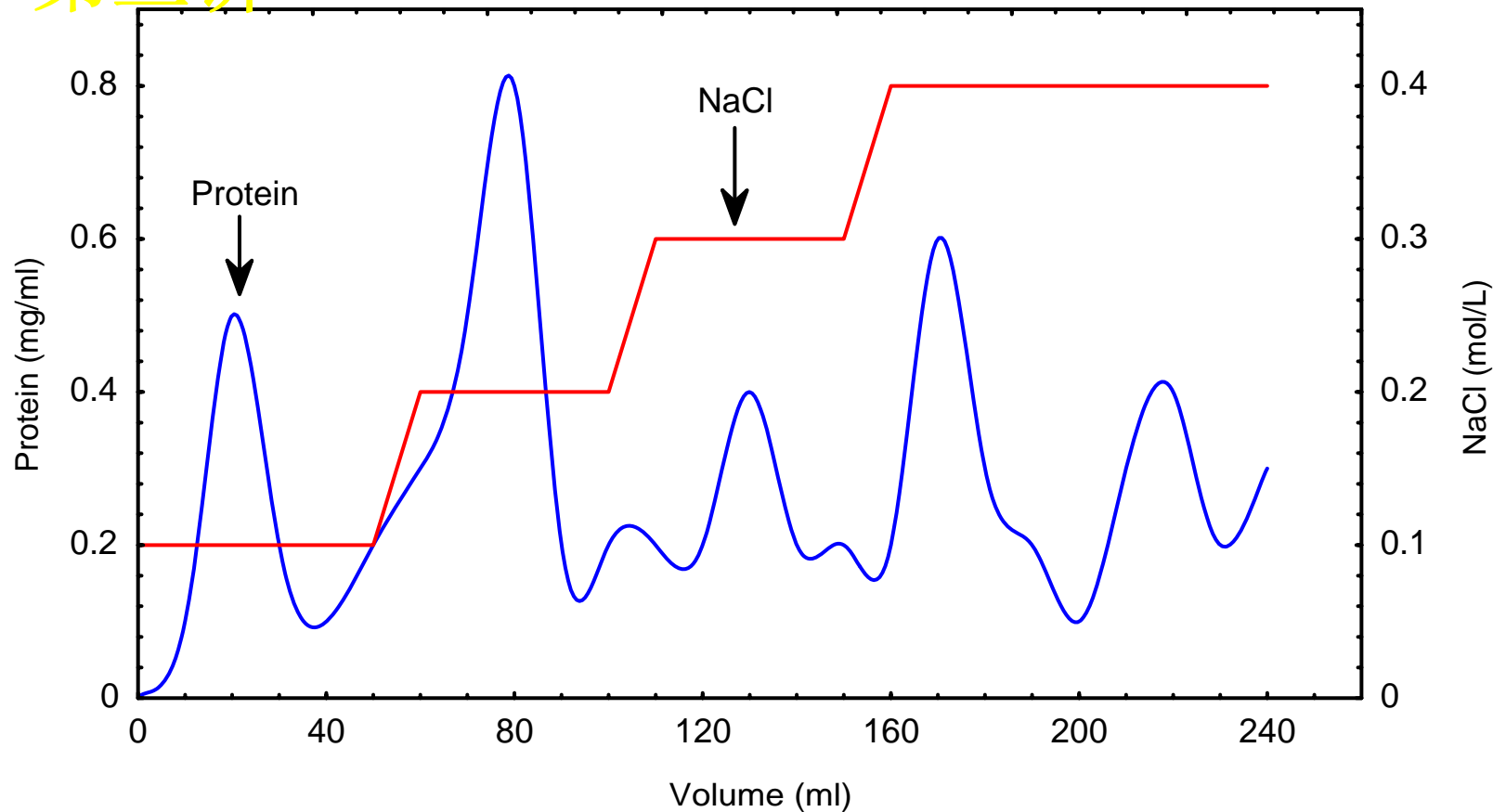
第三讲



恒定洗脱

层析分离法

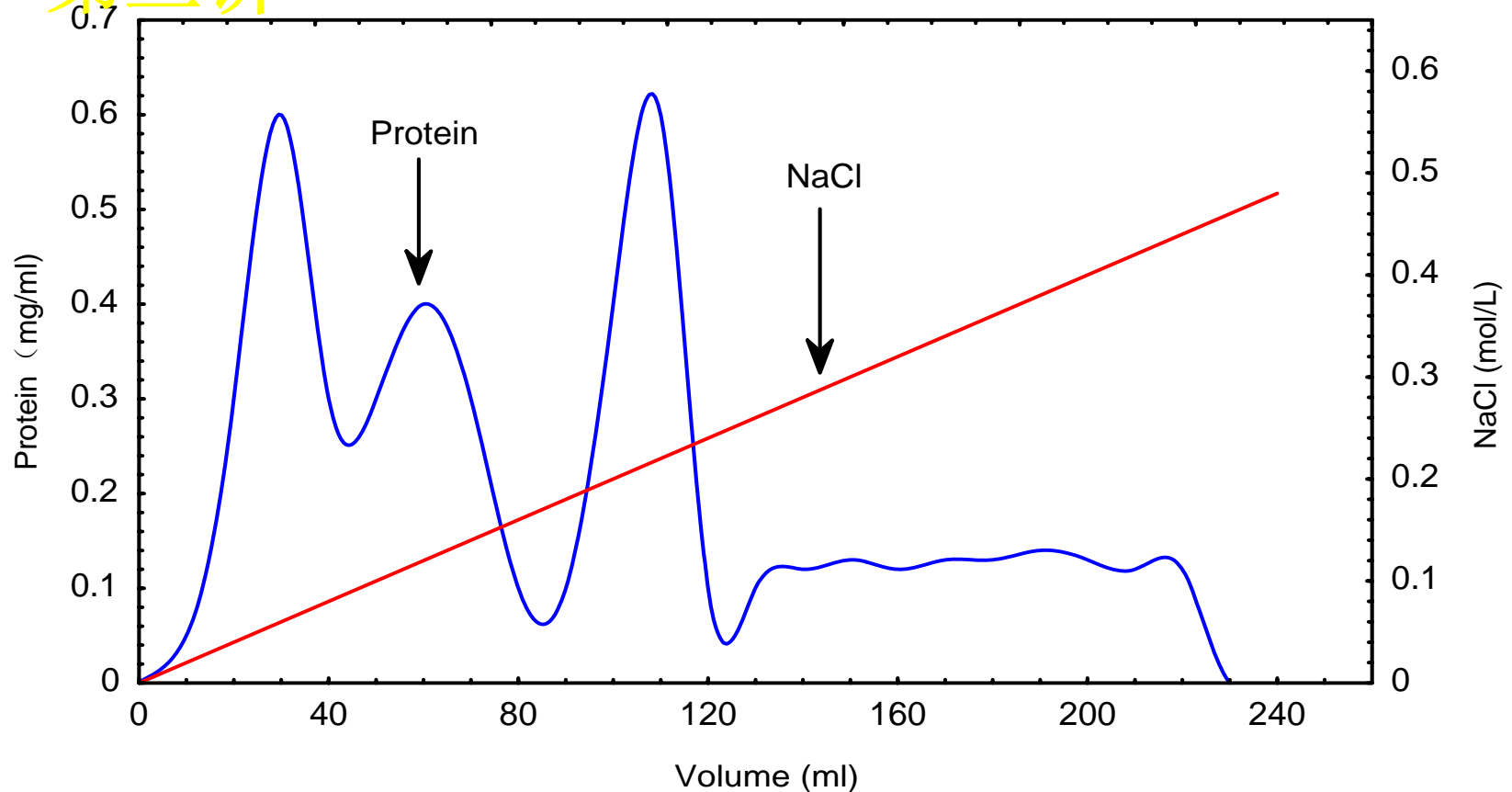
第三讲



分步洗脱

层析分离法

第三讲



(c) 梯度洗脱

层析分离法

■ 第三讲 清洗与再生

- 弱酸：HAC
- 碱：氨水
- 促溶剂：1-3M KCNS， 6-8 M 尿素， 6 M 盐酸胍
- 极性溶剂：20% 乙醇
- 表面活性剂：吐温-80
- 缓冲液平衡



层析分离法

■ 第三讲

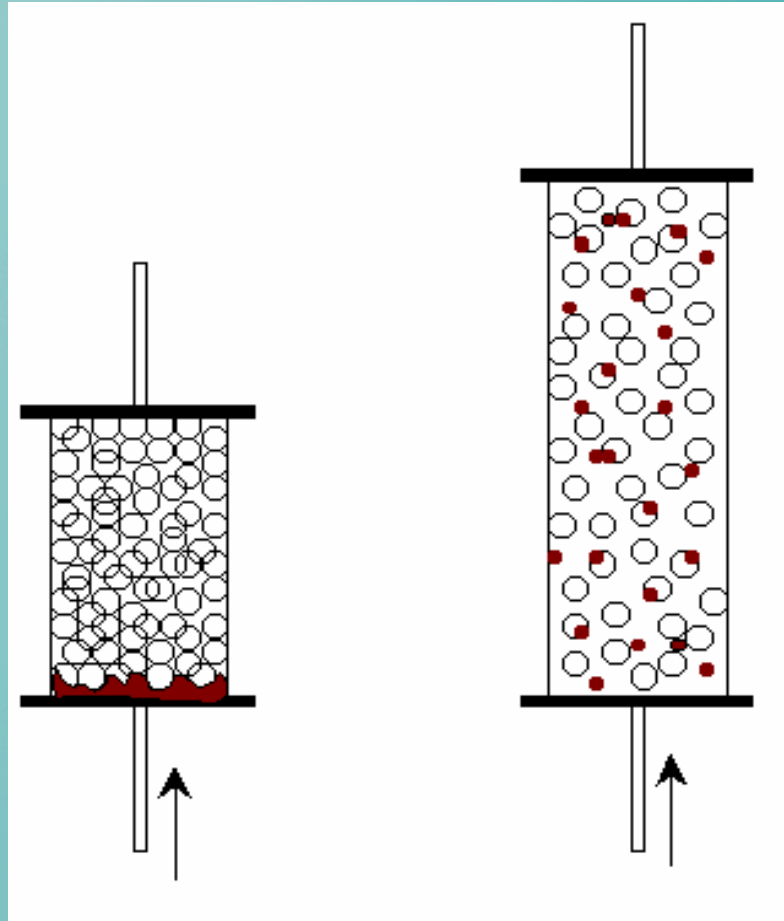
思考题

- 1 配基偶联后残留电荷对分离有何影响？
如何消除？
- 2 小分子配基为何需插入手臂？
- 3 层析柱洗脱方式有几种？各适用于何种情况？



层析分离法

■ 第四讲 层析分离法（第四讲）



层析分离法

■ 第四讲 无机吸附剂

- 羟基磷磷石 (hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)
- (1) 纯化蛋白质的无机介质。
- (2) 廉价, 易于大规模应用,
- (3) 使用后易于清洁
- **吸附机理与规律:** 偶极离子作用而不是离子交换作用
- (1) 每一个正电荷区周围都有负电荷区, 反之亦然 .
- (2) 蛋白质在中性pH范围具有最大的形成毗邻



层析分离法

常用法

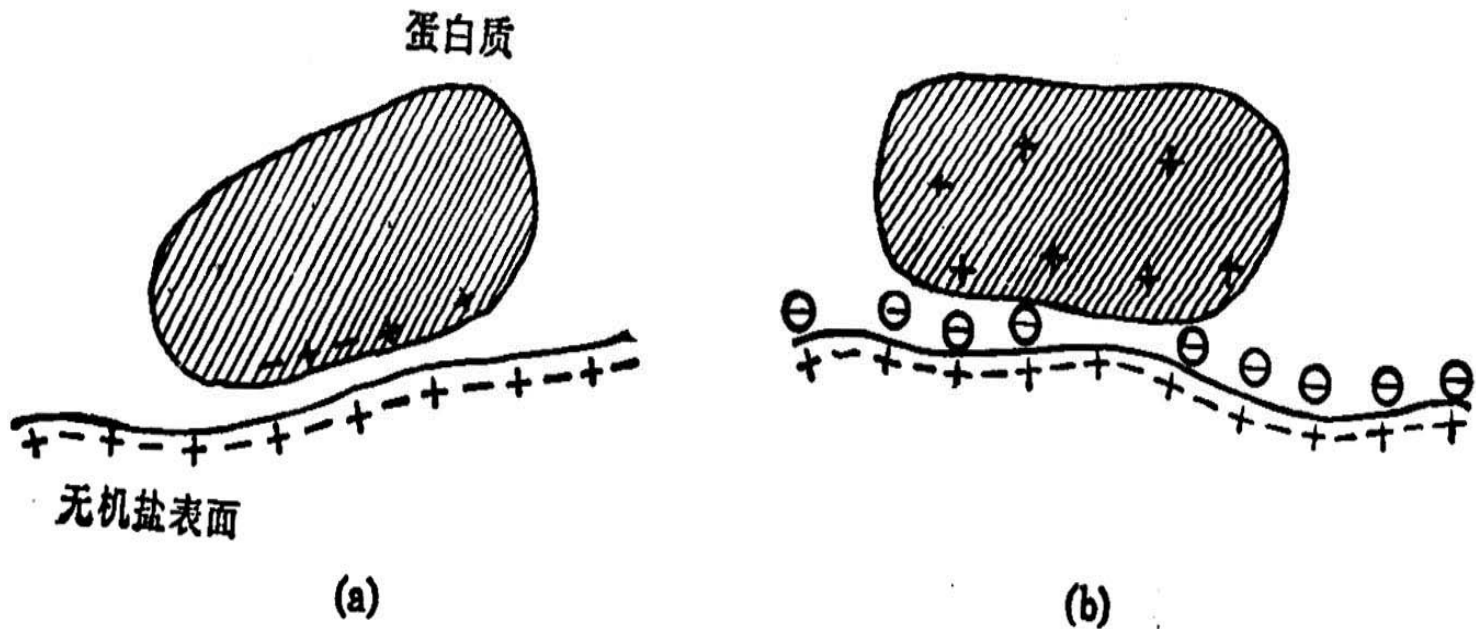


图 22-25 蛋白质在无机盐表面的偶极作用
(a) — 偶极-偶极键合作用；(b) — 缓冲液中离子的影响

层析分离法

■ 第四讲 工艺条件

■ 吸附:

- (1) pH在6—9之间
- (2) 低浓度缓冲液离子（通常是磷酸盐）
- (3) 低盐浓度

洗脱:

- (1) 增加缓冲液浓度
- (2) 高盐浓度中进行
- (3) 盐可以采用恒定或梯度形式应用



层析分离法

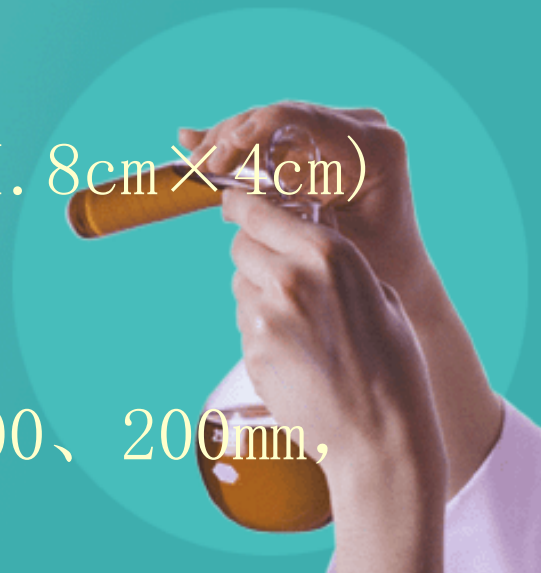
第四讲

《中国海洋药物》杂志 2001 年第 3 期(总第 81 期)

33

紫球藻 B-藻红蛋白的分离纯化

- (1) 光合作用中重要的辅助色素
- (2) 可作为荧光探针
- (3) 天然色素
- (4) 调节和激活免疫反应
- 吸附: 1mm, PH 6.8磷酸缓冲液 (I. 8cm×4cm)
层析柱
- 上样量: 2mL
- 洗脱: 磷酸盐缓冲液1、5、50、100、200mm,
PH 6.8, + 0.1M NaCl溶液



层析分离法

第四讲

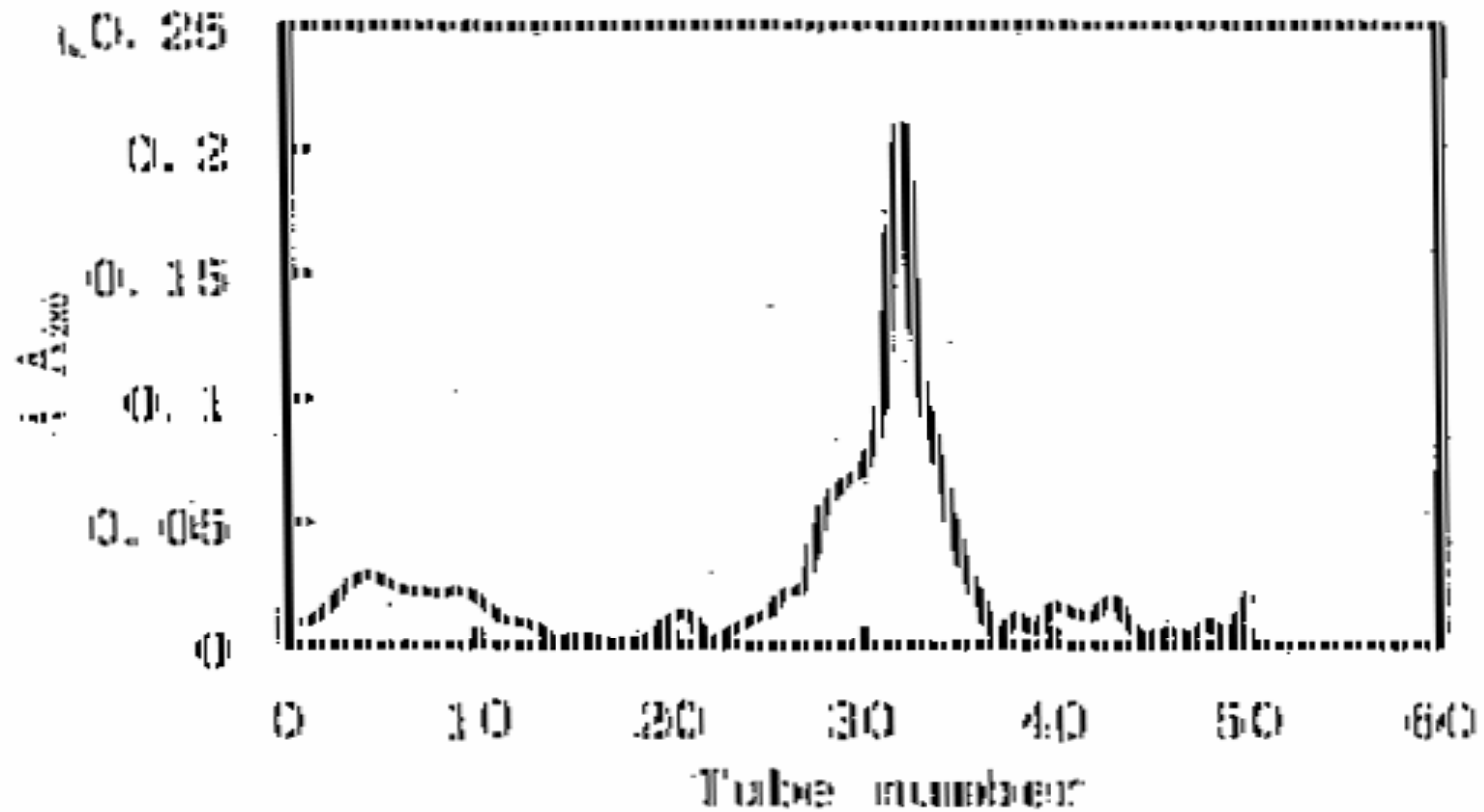


图 1. 用薄层色谱法分离 13-¹⁴C-标记的 DNA 样品。洗脱液: 10% 乙醇。

层析分离法

■ 第四讲

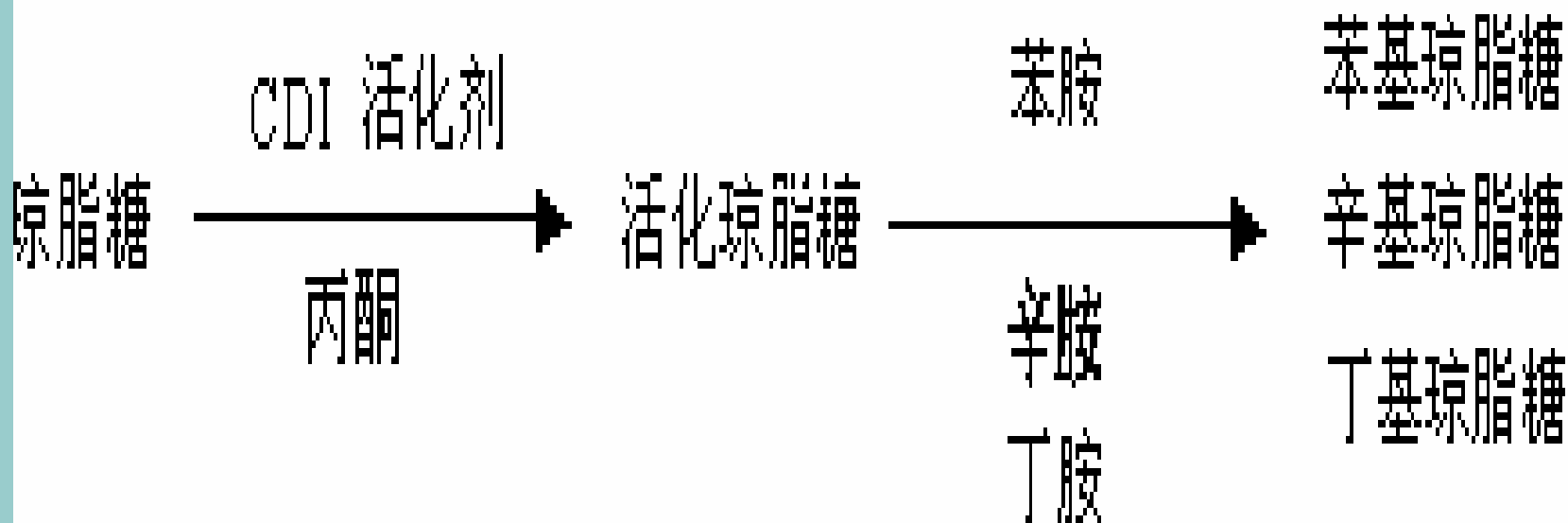
■ 疏水层析

- 将疏水性基团如丁烷、辛烷、苯固定化到介质上，这些基团会与蛋白质生物大分子上的疏水区亲和
- **介质制备：**琼脂糖在有机溶剂中用CDI (羰基二咪唑)活化后再与芳胺或烷胺形成酰胺键得到疏水层析介质
- **介质配基密度：**40—80 $\mu\text{mol}/\text{ml}$ 胶，
- **吸附容量：**牛血清蛋白(BSA)大于40mg/ml



层析分离法

■ 第四讲



疏水层析介质制备过程示意图

层析分离法

■ 第四讲

工艺条件

- 吸附：
 - (1) 盐浓度：高盐，1—2M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 或NaCl
 - (2) pH：中性或偏酸性
- 淋洗：0.5—2%表面活性剂
- 洗脱：
 - (1) 低盐，0.1—0.5M NaCl，再配合pH变化。
 - (2) 低浓度促溶剂, 0.1—0.5 %NaSCN, 或20—40%乙二醇
- 疏水层析实验方案.



层析分离法

第四讲

Preparation of high purity urokinase using single step hydrophobic interaction chromatography of p-aminobenzamidine ligand

- Xuejun Cao^a, Jianhua Zhou^b, Zhenhui Huang,^b Xingyan Wu^a and Byung Ki Hur^c *
-
- ^a State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, Department of Biochemical Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China
- ^b Research Center, Shanghai No.1 Biochemical and Pharmaceutical Company, Shanghai, 200041, China
- ^c Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea
- Introduction
- Material and Method
- Results and Discussion
- Conclusion
-
- * conresponce author: Tel: + 82-32-860-7512
- e-mail: biosys@inha.ac.kr
- Fax:+82-32-8750827
-

层析分离法

第四讲

Urokinase purification

1 Crude material solution $\xrightarrow[\text{desalting}]{\text{ultrafiltration}}$ retentate $\xrightarrow{\text{ion exchange column}}$

effluent $\xrightarrow{\text{affinity chromatography}}$ effluent $\xrightarrow{\text{Gel chromatography}}$

large molecular weight Urokinase

2 Crude material solution $\xrightarrow{\text{affinity chromatography}}$ effluent $\xrightarrow{\text{affinity chromatography}}$

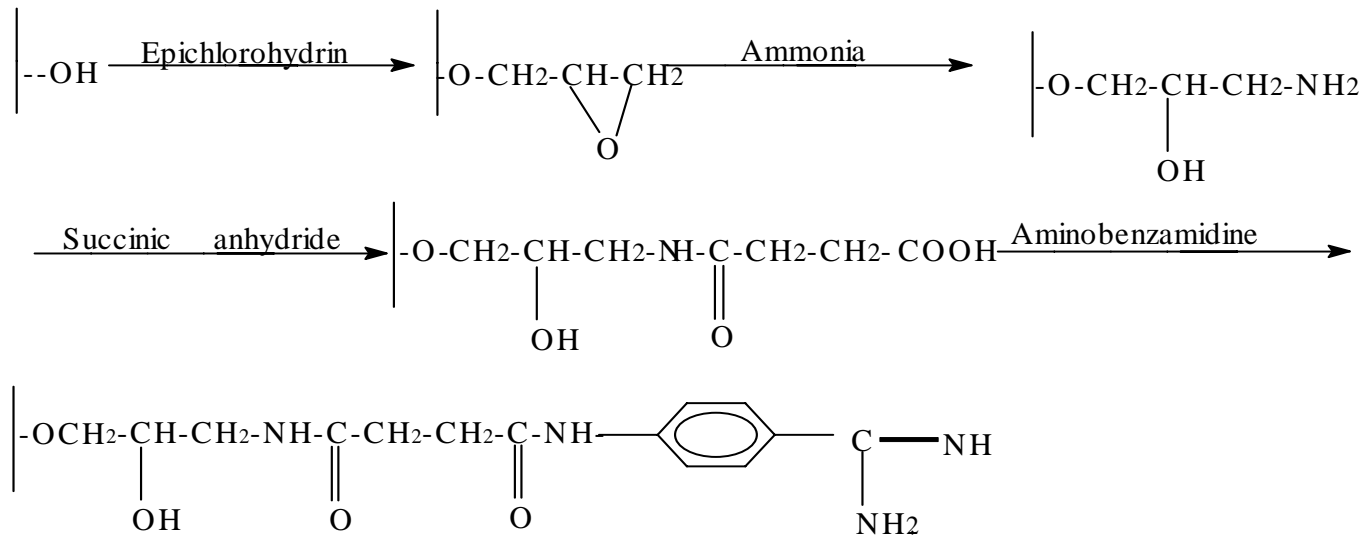
effluent

3 Crude material solution $\xrightarrow{\text{affinity chromatography}}$ effluent

层析分离法

■ 第四讲

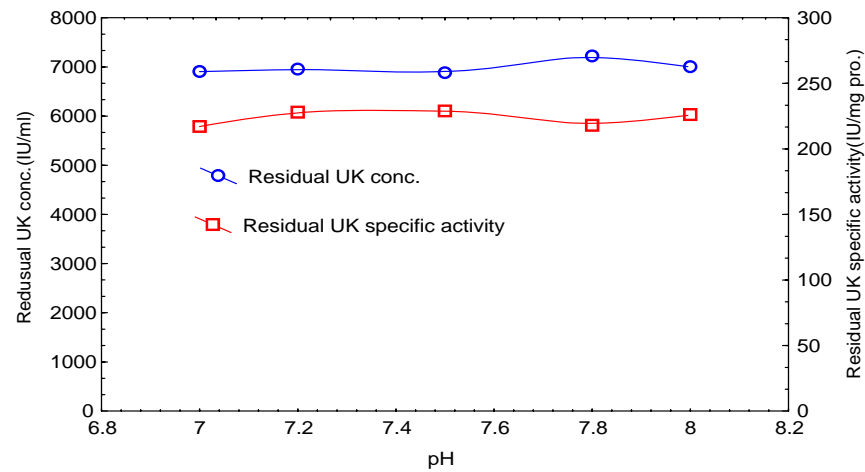
Fig. 1. Reaction Sequence for the preparation of affinity gel



层析分离法

第四讲

Fig. 2. Effect of phosphate pH on urokinase bound on p-AB gel

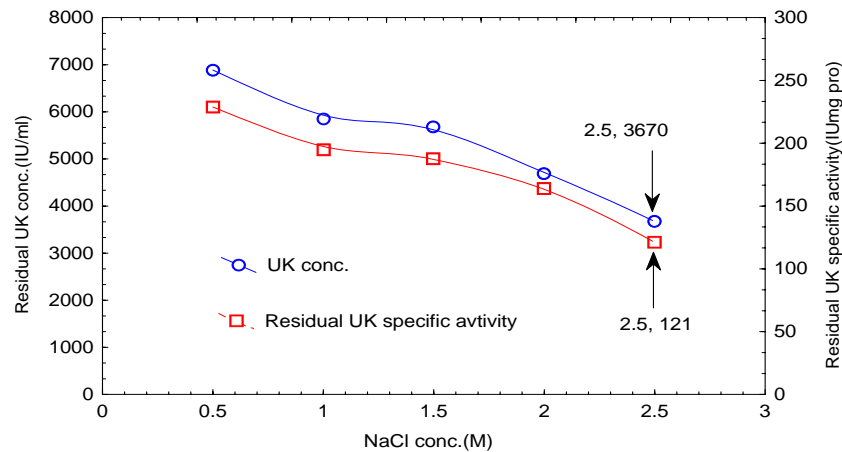


0.05M phosphate and 2.5 M NaCl

层析分离法

第四讲

Fig. 3. Effect of NaCl concentration on urokinase bound on p-AB

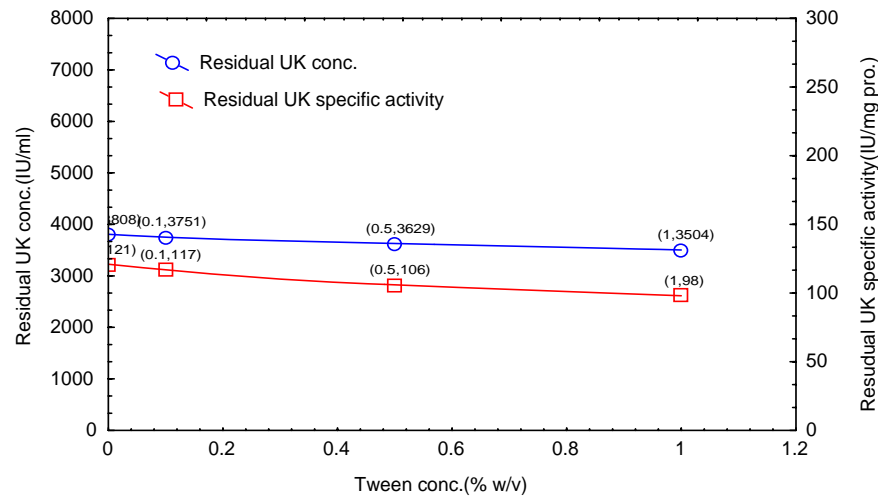


0.05M phosphate and pH 7.0

层析分离法

第四讲

Fig. 4. Effect of Tween 80 concentration on adsorption of urokinase on p-AB-sepharose 4B

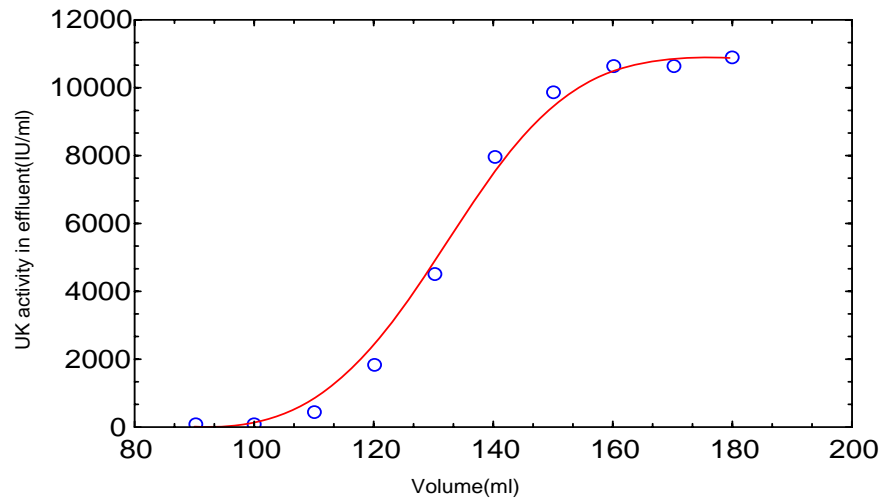


2.5 M NaCl , pH 7.0 and 0.05M phosphate

层析分离法

第四讲

Fig. 5. Breakthrough of urokinase bound on p-AB affinity column



Column size : 1.0×12 cm with 10g of wet gel; Urokinase conc.: 11083 IU/ml; Conditions: 0.05 M phosphate, 2.5 M NaCl and 1% Tween 80 at pH 7.0; Flow rate 0.2 ml/min; **Maximal adsorption capacity: 142700IU/g wet gel**

层析分离法

第四讲

Table 1 Effect of Tween 80 concentration on washing contaminant of urokinase on p-AB-sepharose 4B

• T ₈₀ Conc.(% w/v)	UK conc.(IU/ml)	Protein conc.(mg/ml)	Specific activity (IU/mg)
• 0.1	1083	4.0	271
• 0.5	1214	5.6	214
• 1.0	1258	6.4	196
• 5.0	1279	11.0	116
• 0.1 + (0.05M P + 0.5 M NaCl, pH 7.0)	2013	5.4	373
• 0.5 + (0.05M P + 0.5 M NaCl, pH 7.0)	2233	8.0	279
• 1.0 + (0.05M P + 0.5 M NaCl, pH 7.0)	2196	6.8	323
• 5.0 + (0.05M P + 0.5 M NaCl, pH 7.0)	2238	11.4	196
• 0.05M P + 0.5 M NaCl, pH 7.0	2438	4.2	580
• 0.05M P + 1.0 M NaCl, pH 7.0	2241	4.6	487
• 0.05M P + 2.5 M NaCl, pH 7.0	1392	3.0	464

层析分离法

■ 第四讲

Table 2 Selection of eluants of urokinase bound on p-AB-sepharose 4B

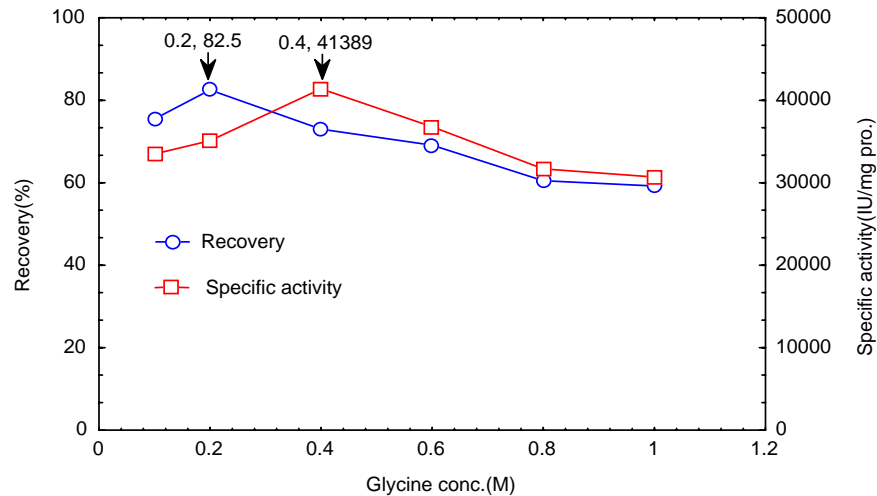
• Eluants	UK conc.(IU/ml)	Pro. conc.(mg/ml)	Sp activity (IU/mg)	Rec(%)
• PH 9.0, 0.1 M Arg	5503	0.357	15414	89.9
• PH 3.0, 0.2 M Gly	5046	0.128	39422	82.4
• PH 9.0, 0.2 M Gly	3380	0.188	28644	55.2
• PH 9.0, 0.05 M Tris	4764	0.352	13534	77.8
• PH 3.0, 0.1 M HAC	3835	0.122	31434	62.6
• PH 4.0, 0.1 M HAC	3028	0.17	17812	49.5
• PH 4.0, 0.1M Phosphate	4032	0.16	25200	70.0
• PH 9.0, 0.1 M Carbonate	4592	0.194	23670	75.0

- NaCl conc. 0.5 M, temperature 8°C
- UK: Urokinase; Pro: protein; Sp: specific; Rec: Recovery

层析分离法

■ 第四讲

Fig. 6. Effect of glycine concentration on elution of urokinase bound on p-AB-sepharose 4B

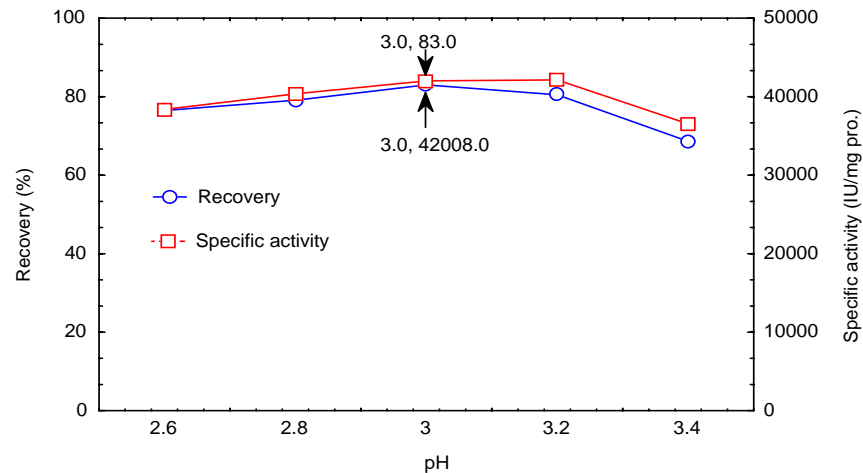


pH 3.0, 0.5M NaC

层析分离法

第四讲

Fig. 7. Effect of glycine pH on elution of urokinase bound on p-AB-sepharose 4B

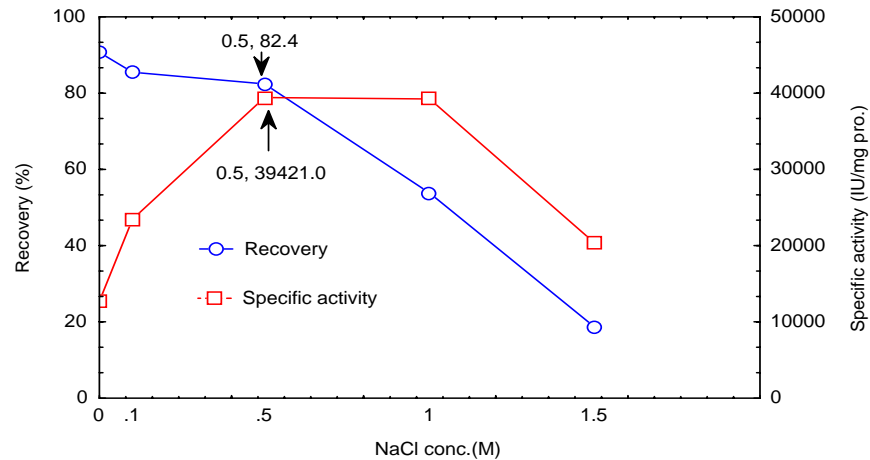


0.2 M glycine and 0.5M NaCl

层析分离法

第四讲

Fig. 8. Effect of NaCl concentration on elution of urokinase bound on p-A-sepharose 4B

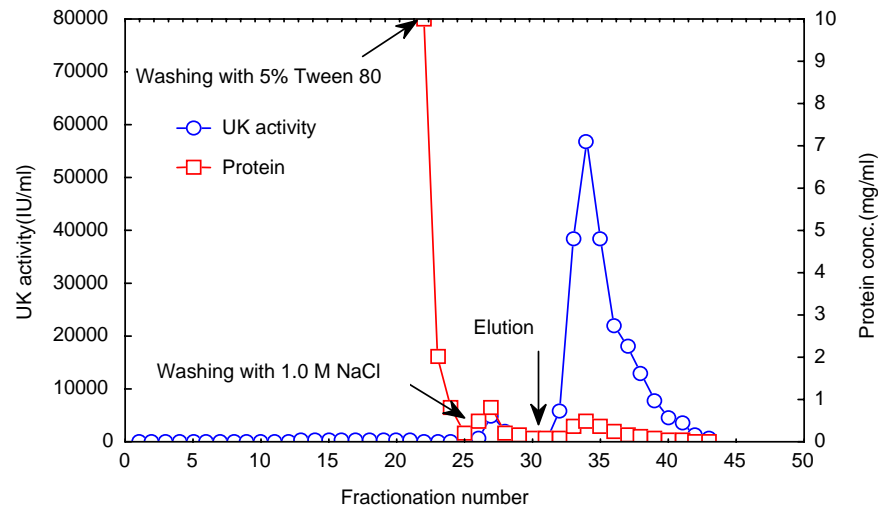


at 0.2 M and pH 3.0)

层析分离法

第四讲

Fig. 9. Column purification curve of urokinase



Urokinase volume: 100ml; Urokinase conc: 11083 IU/ml; Adsorption buffer: 0.05 M phosphate, 2.5 M NaCl and 1% Tween 80 at pH 7.0; Column size: 1.0×12cm with 10g of wet p-AB gel; Flow rate: 0.2ml/min. Washing 1: 50 ml of 5% Tween 80 Washing 2: 0.1 M phosphate buffer containing 1.0 M NaCl (pH 4.1); Elution condition: 0.2 M glycine containing 0.5 M NaCl at pH 3.0

层析分离法

第四讲

Table 3 result of column purification of urokinase

Steps	Volume ml	UK conc. IU/ml	Pro conc.(mg/ml)	Recovery (%)	Sp activity (IU/mg pro)
Loading	120	10108	44	-	231
Effluent	120	293	-	2.9	-
Washing 1 ^a	30	88	-	0.2	-
Washing 2 ^b	30	2617	0.11	6.5	23035
Elution	70	15019	0.12	86.7	124300

层析分离法

第四讲

Conclusion

- 1 Urokinase purity could be obviously improved by using 1% Tween 80 in crude material solution and 5% Tween 80 in washing buffer
- 2 Glycine elution buffer could elute urokinase with more selectivity from column
- 3 Affinity mechanism is hydrophobic interaction and structure specificity

层析分离法

- **第四讲** 固定化金属离子亲和层析
(Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography)
 - 亚氨二醋酸盐与环氧活化的琼脂糖偶合, 可以形成一种带有双羧甲基氨基琼脂糖, 进而与过渡金属离子 (Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ni^{2+}) 牢固螯合, 形成稳定的吸附活性中心
 - **吸附机理:** 金属螯合介质能与蛋白质中的组氨酸上的咪唑基及半胱氨酸上的巯基结合



层析分离法

■ 第四讲

工艺条件

■ 吸附:

- (1) pH 中性
- (2) 低盐
- (3) 金属离子

■ 洗脱:

- (1) 降低pH
- (2) 提高盐浓度
- (3) 缓冲液中加入螯合剂EDTA

其因蛋白质的组氨酸残基



层析分离法

第四讲

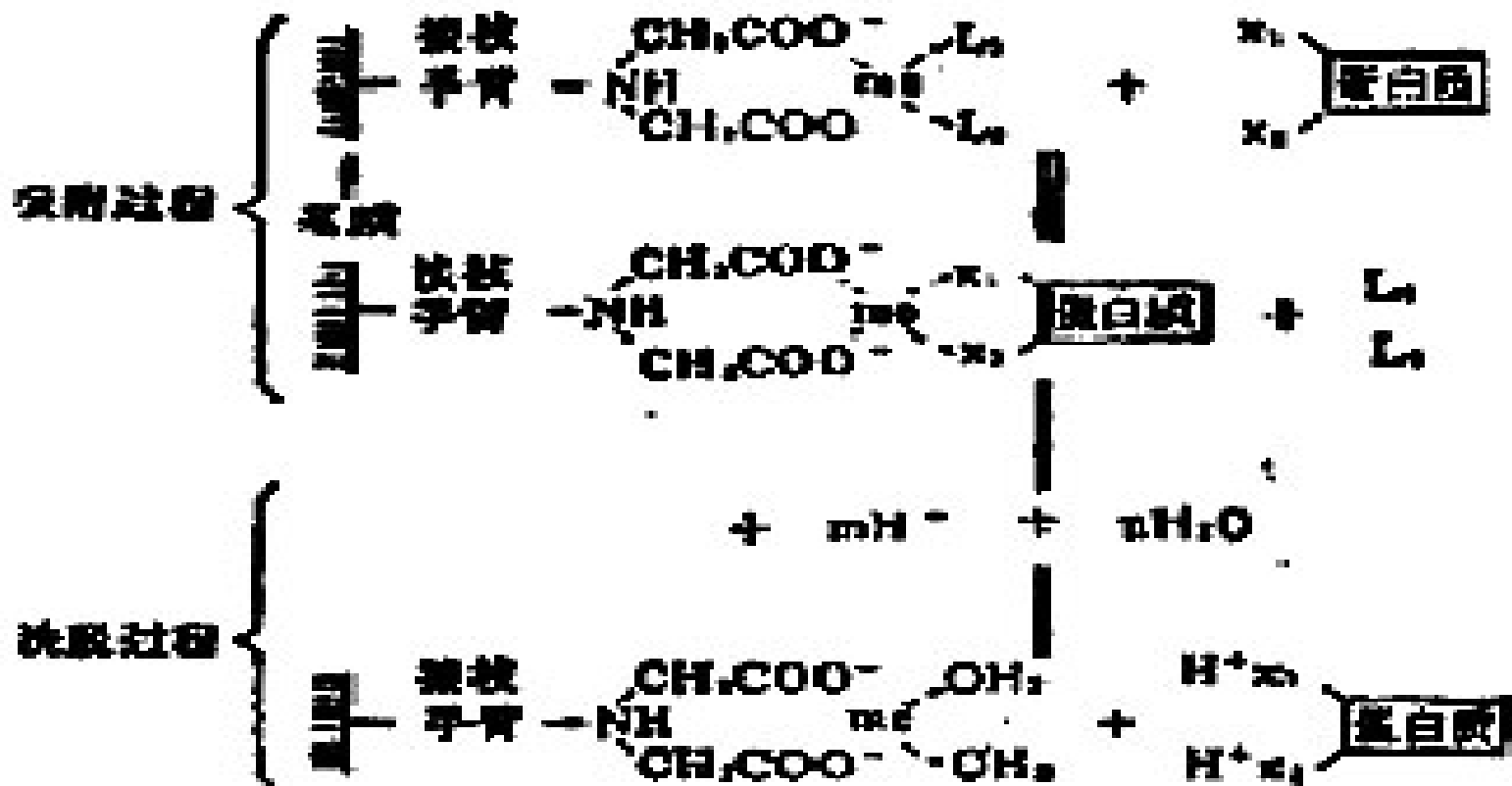


图 22-18 金属离子层析分离法的作用过程

层析分离法

第四讲

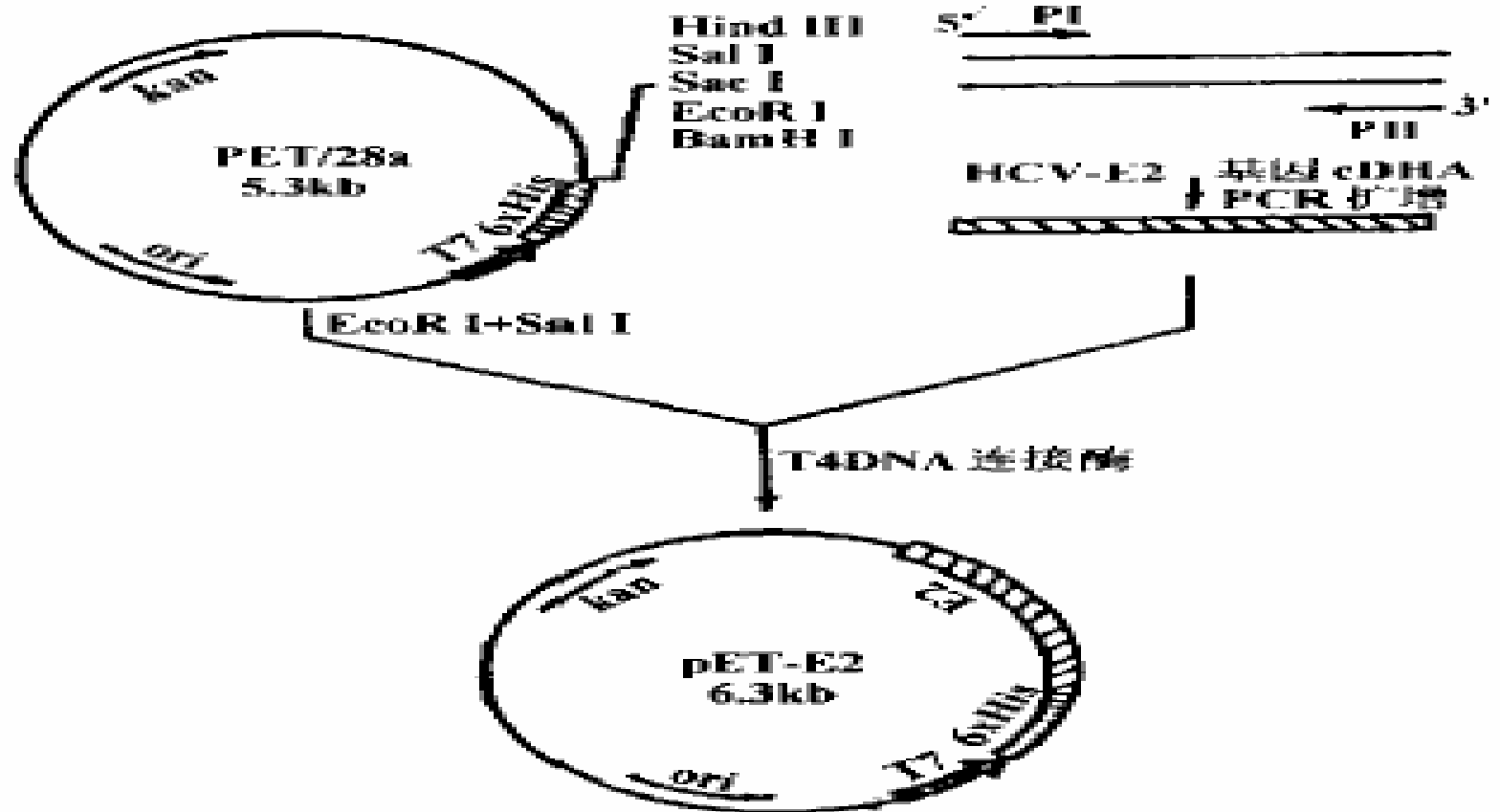


图 1 pET-E2 重组质粒的构建

层析分离法

■ 第四讲

· 144 ·

中国生物制品学杂志 2000 年第 13 卷第 3 期 Chin J Biologicals 2000, Vol. 13, No. 3

丙型肝炎病毒 E2 抗原基因的克隆、表达及纯化

- 吸附: Ni^{2+} 亲和
- pH: 7.5
- 洗脱: 7.5-4.0 梯度



层析分离法

第四讲

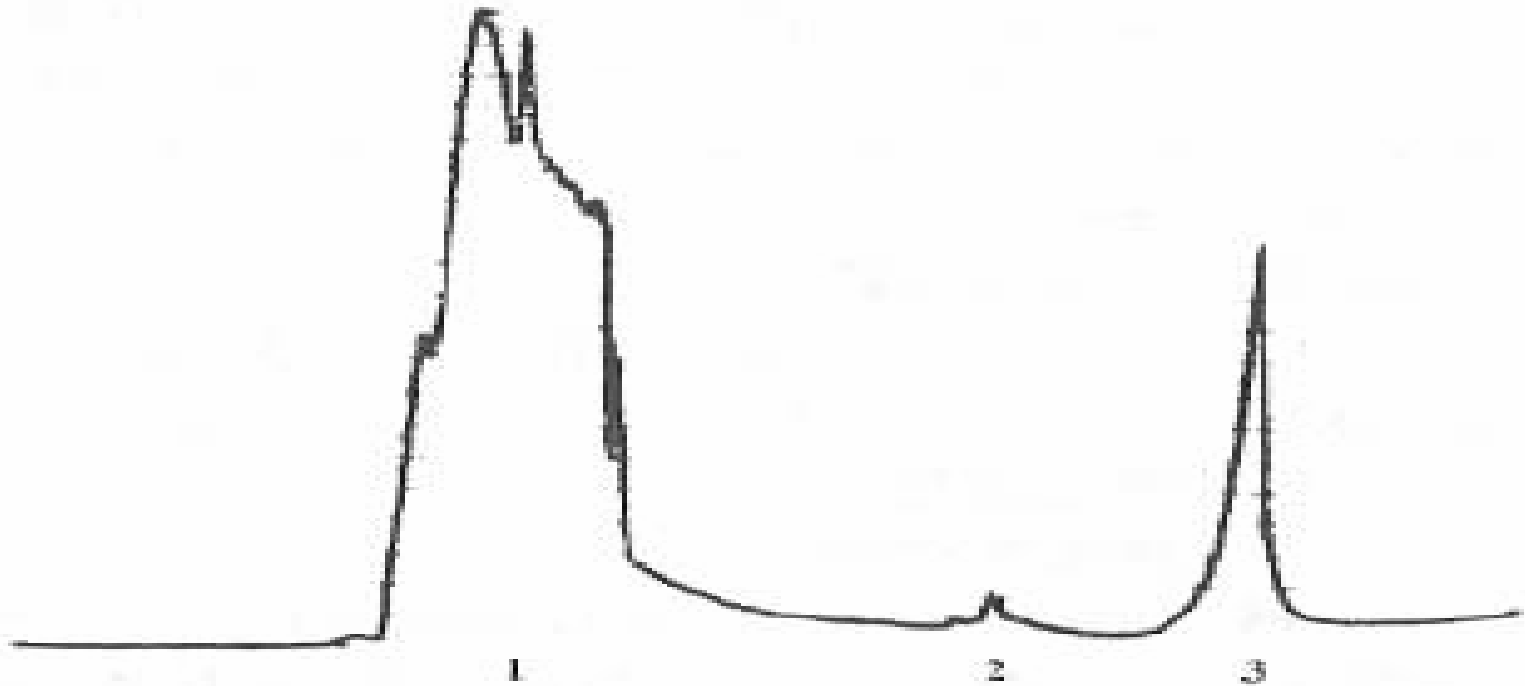


图4 表达产物的 IMAC 纯化

Fig 4. Purification of expressed E2 protein by IMAC

1, flow through peak; 2, eluted protein at pH5; 3, eluted E2 antigen at pH4.

层析分离法

■ 第四讲

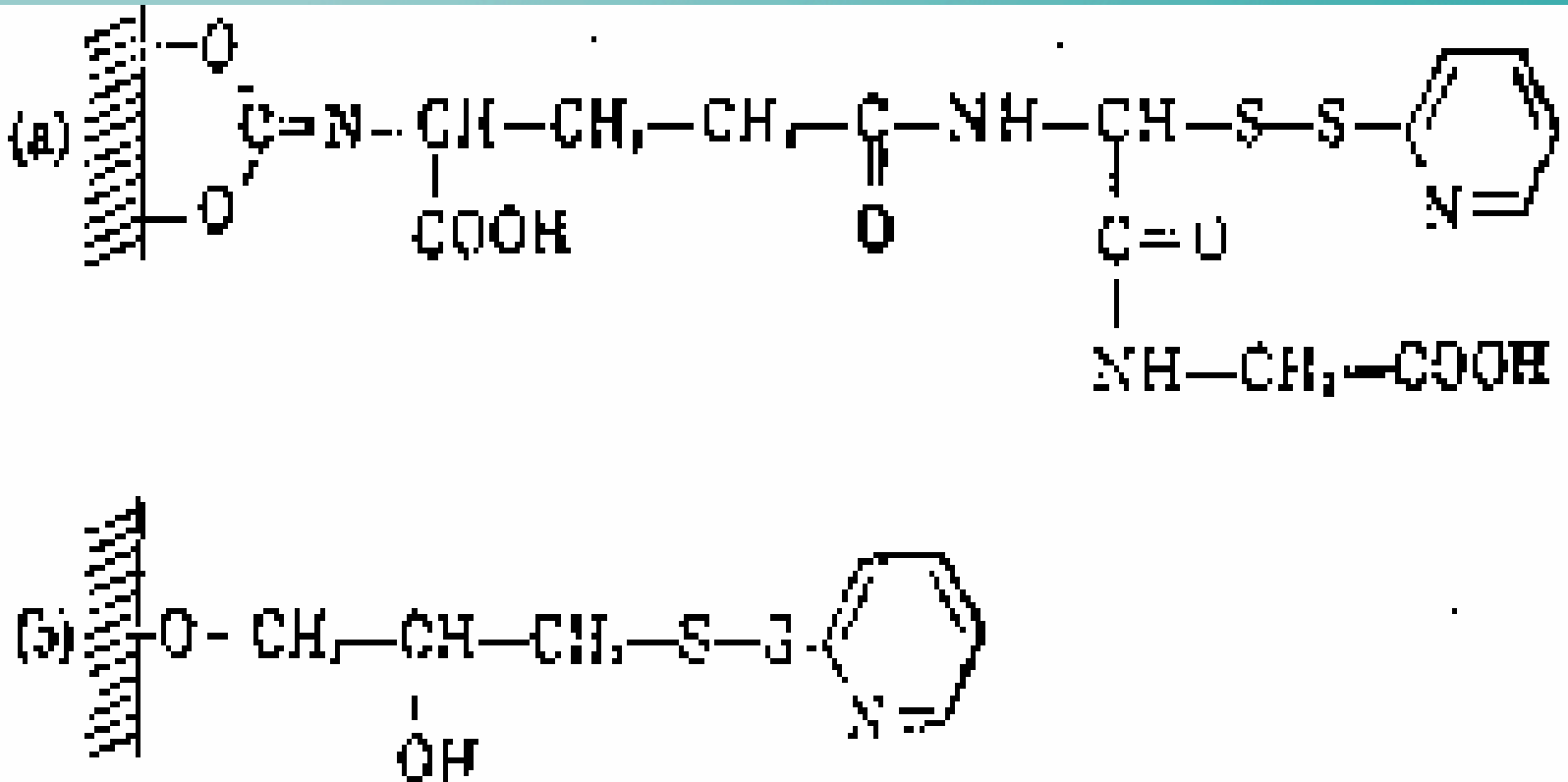
共价层析

- 共价层析是根据巯基化合物与层析剂上二硫键的共价化学反应而设计的



层析分离法

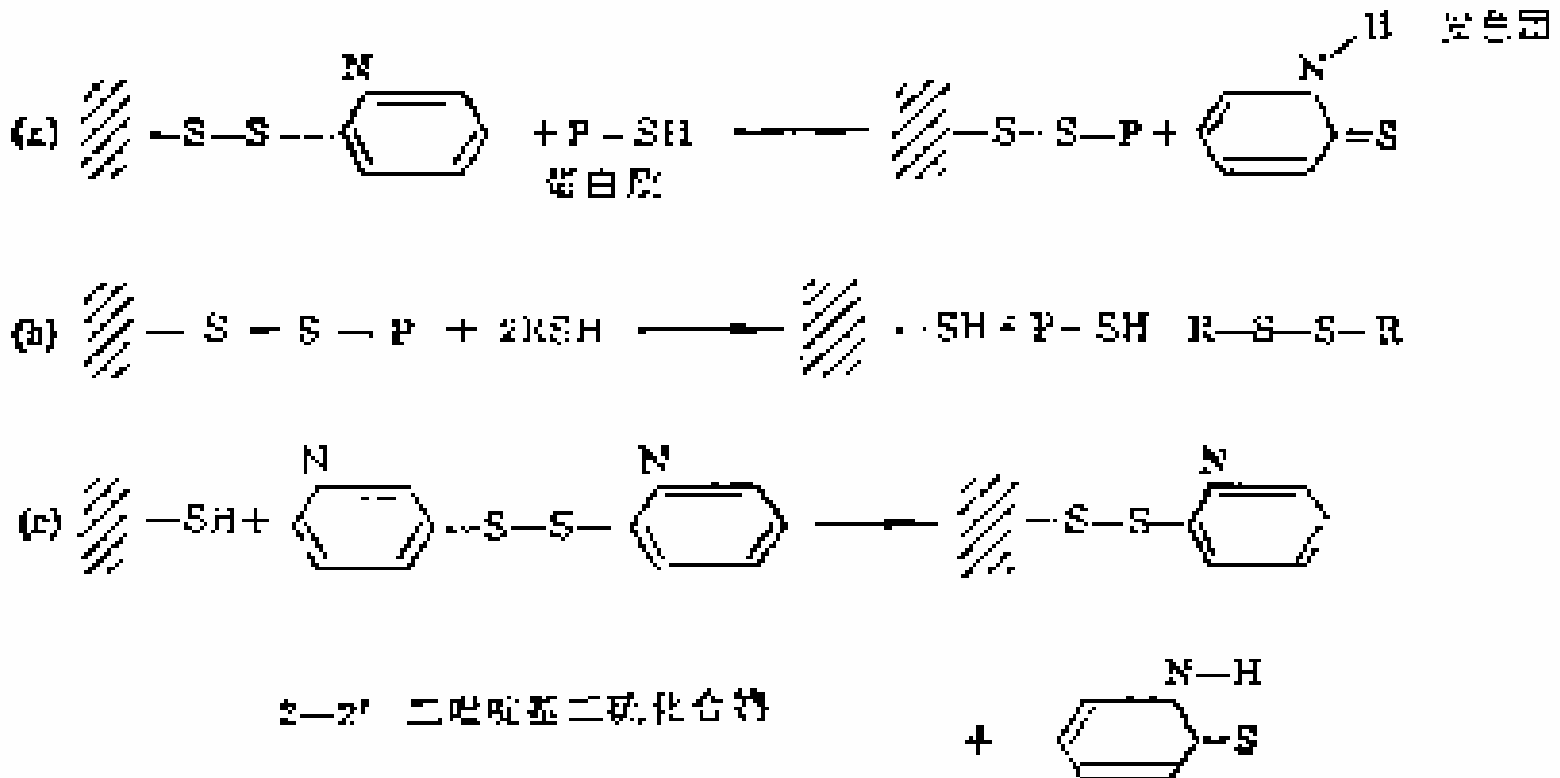
■ 第四讲



谷胱甘肽型二硫键层析剂与巯丙基型二硫键层析剂 (a)
谷胱甘肽二硫键层析剂 (b) 巯丙基型二二硫键层析剂

层析分离法

第四讲

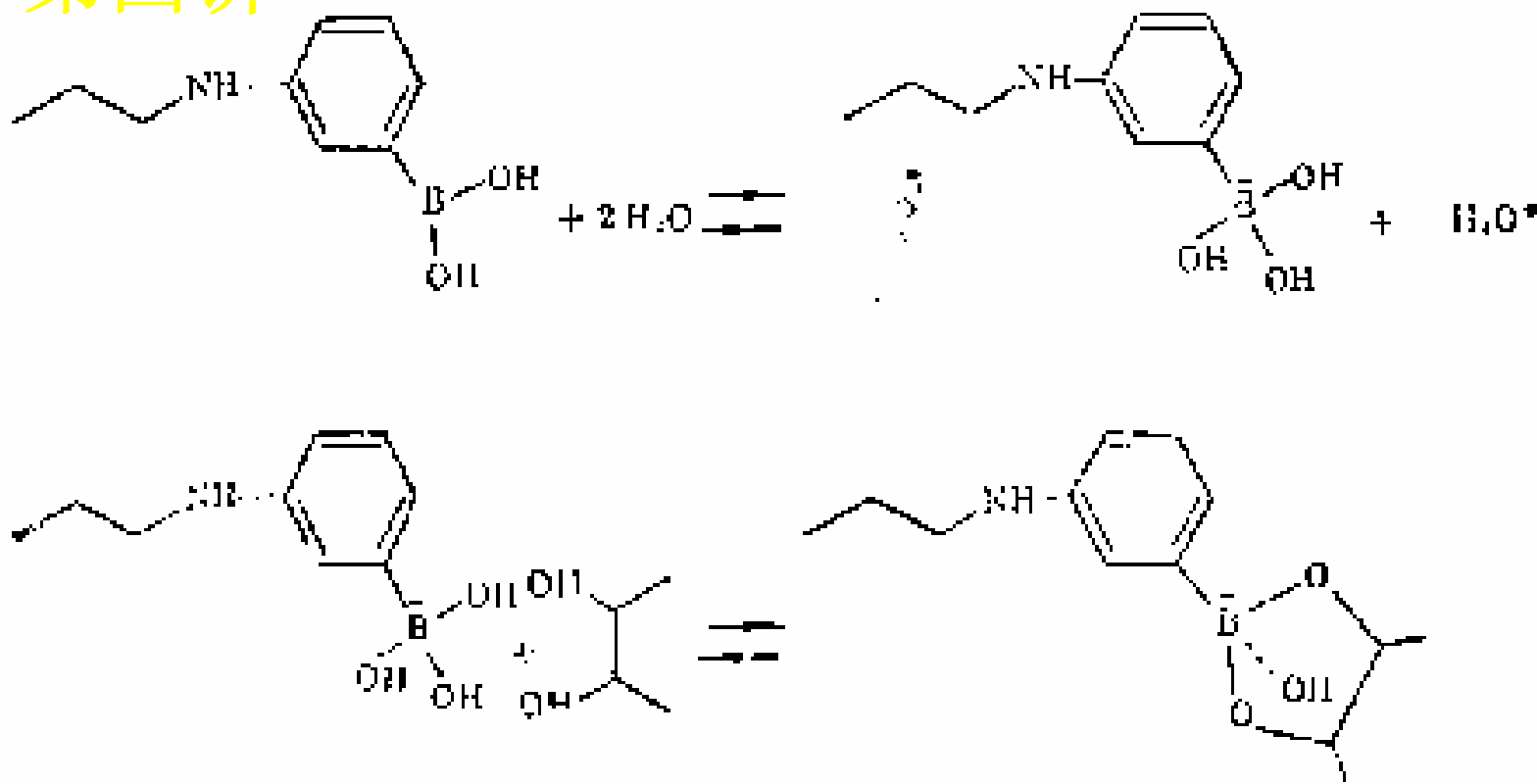


靠巯基二硫键作用的共价层析分离过程

吸附过程 (b) 洗脱过程 (c) 再生过程

层析分离法

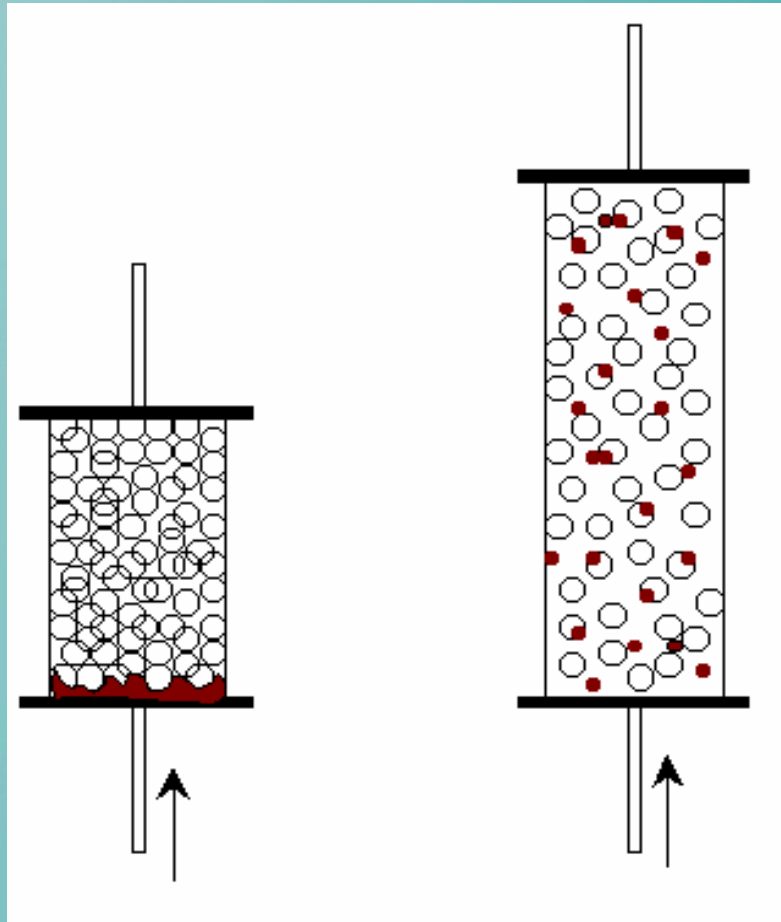
■ 第四讲



苯基硼酸盐与1, 2顺二元醇化合物的反应

层析分离法

■ 第五讲 层析分离（第五讲）



层析分离法

■ 第五讲 谷胱甘肽巯基转移酶 (GST) 共价层析

- (1) 将GST基因结合到目标蛋白基因上
制成

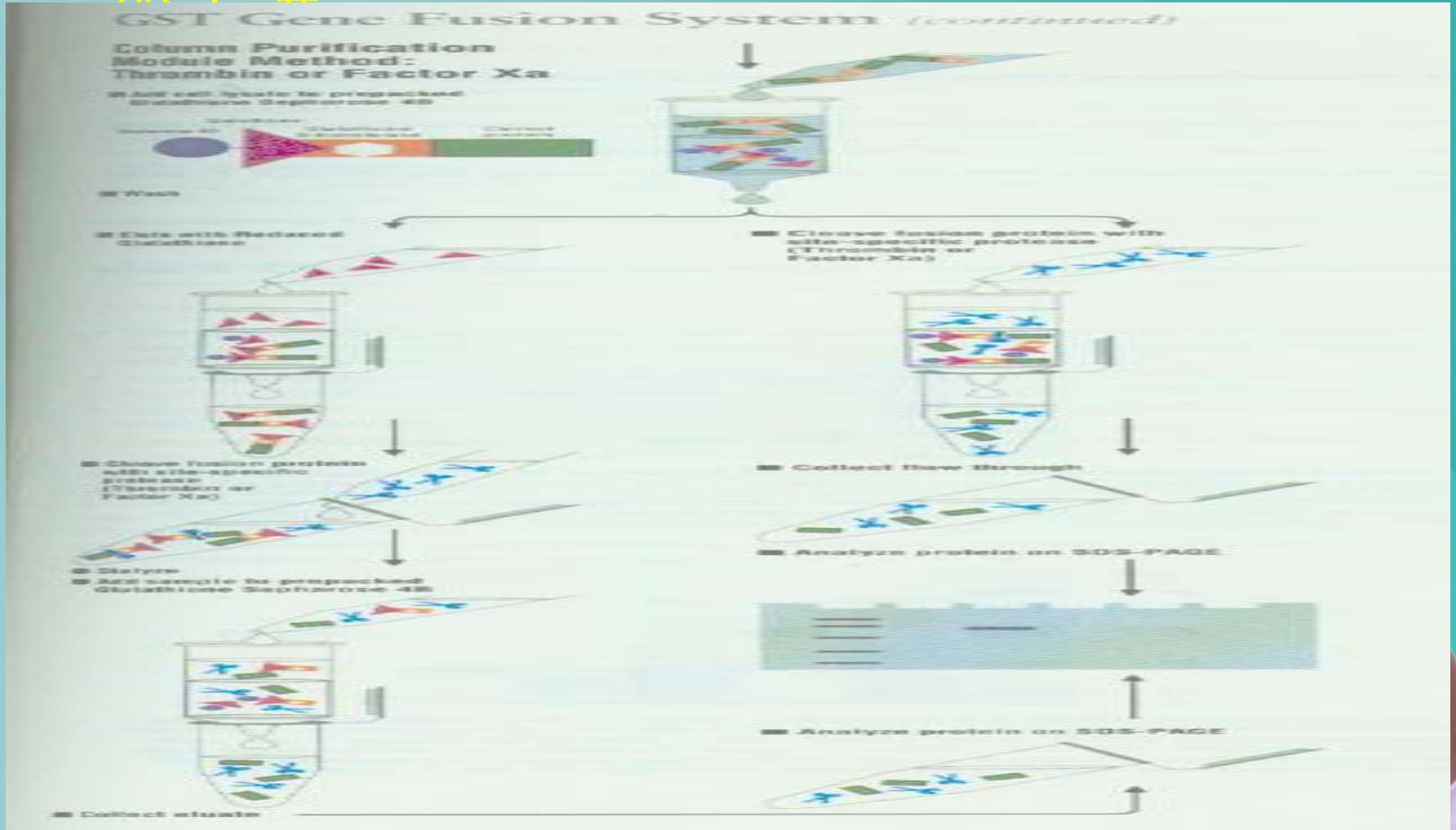
表达融合蛋白

- (2) 用谷胱甘肽亲和介质吸附GST目标蛋白
- (3) 用酶切除GST，得到纯化目标蛋白



层析分离法

林丁山



层析分离法

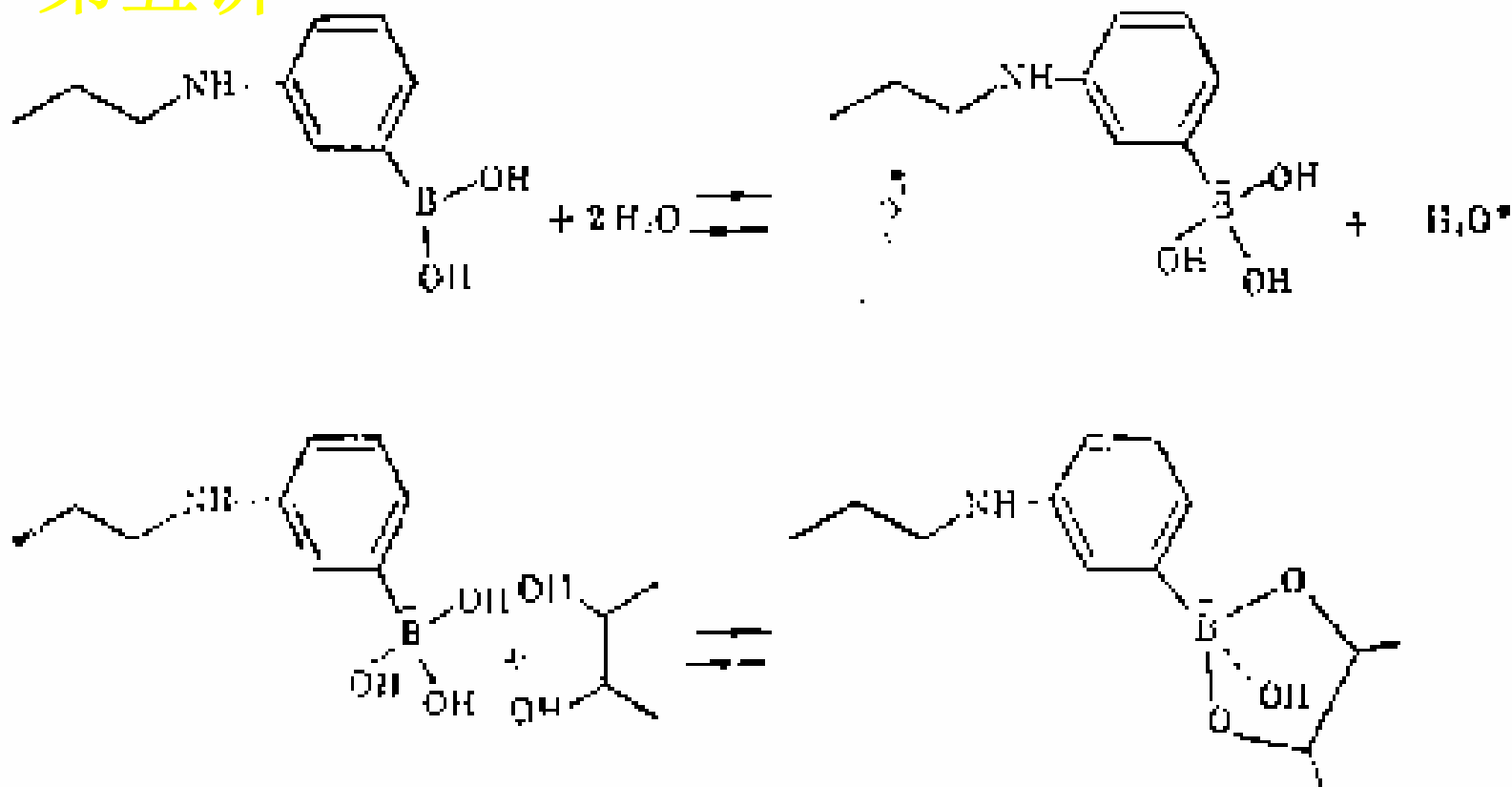
■ 第五讲 苯硼酸共价层析

- 利用硼原子与邻二羟基结构的糖形成共价五元环结构
- 吸附：
 - (1) pH 8-9
 - (2) 高盐促进苯基吸附
- 洗脱：
 - pH 3-4,
 - Tris 缓冲液, 甘露醇
- 应用：糖蛋白, 核苷酸, 多糖



层析分离法

■ 第五讲



苯基硼酸盐与1, 2顺二元醇化合物的反应

层析分离法

■ 第五讲 蛋白质的离子交换层析

- 层析介质：DEAE-纤维素，CM-纤维素
- 吸附条件：
 - (1) 缓冲液pH
 - (2) 蛋白浓度控制 (5mg/ml)
 - (3) 离子强度
 - (4) 道南效应(Donnan effect) 介质内外盐浓度及pH不同
 - (5) 上样量：1-5%BV，高径比20:1，L: 100cm(恒定洗胶)；5-10%qm，柱长度20-40cm，高径比5:1(分步或梯度)



层析分离法

第五讲

界面

树脂相

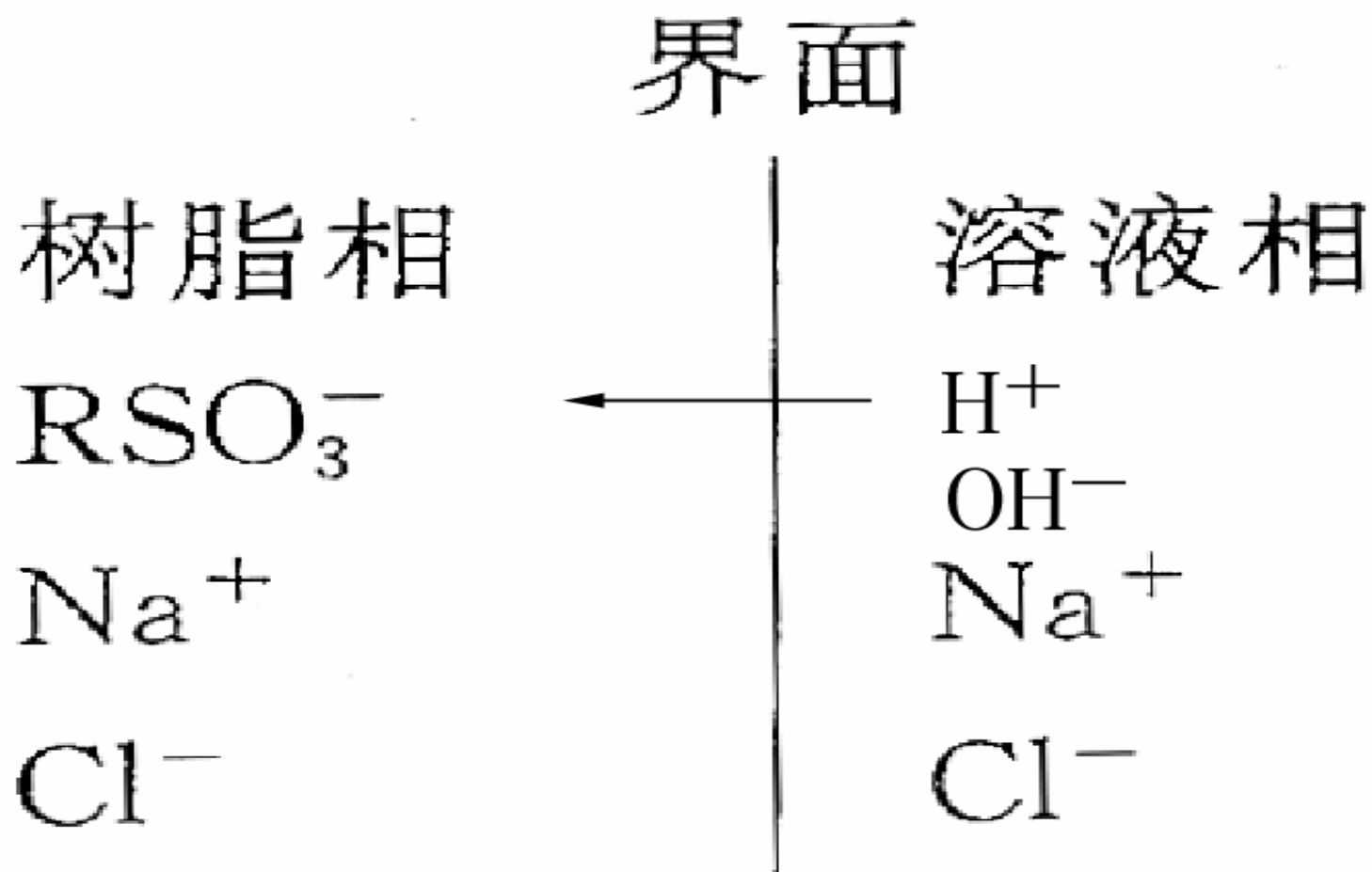


溶液相



层析分离法

第五讲



层析分离法

第五讲

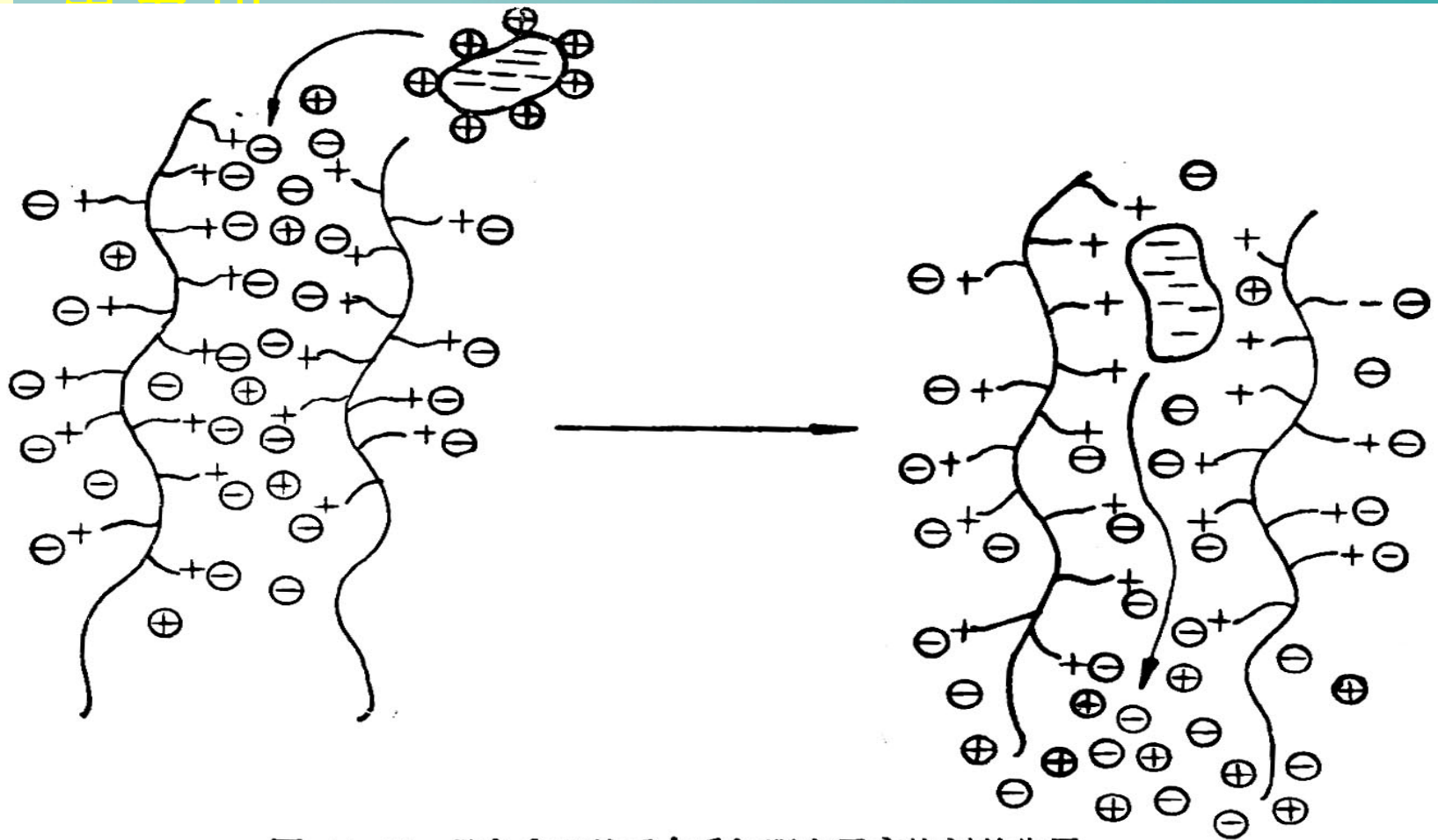


图 22-23 带负电荷的蛋白质与阴离子交换剂的作用

层析分离法

第五讲

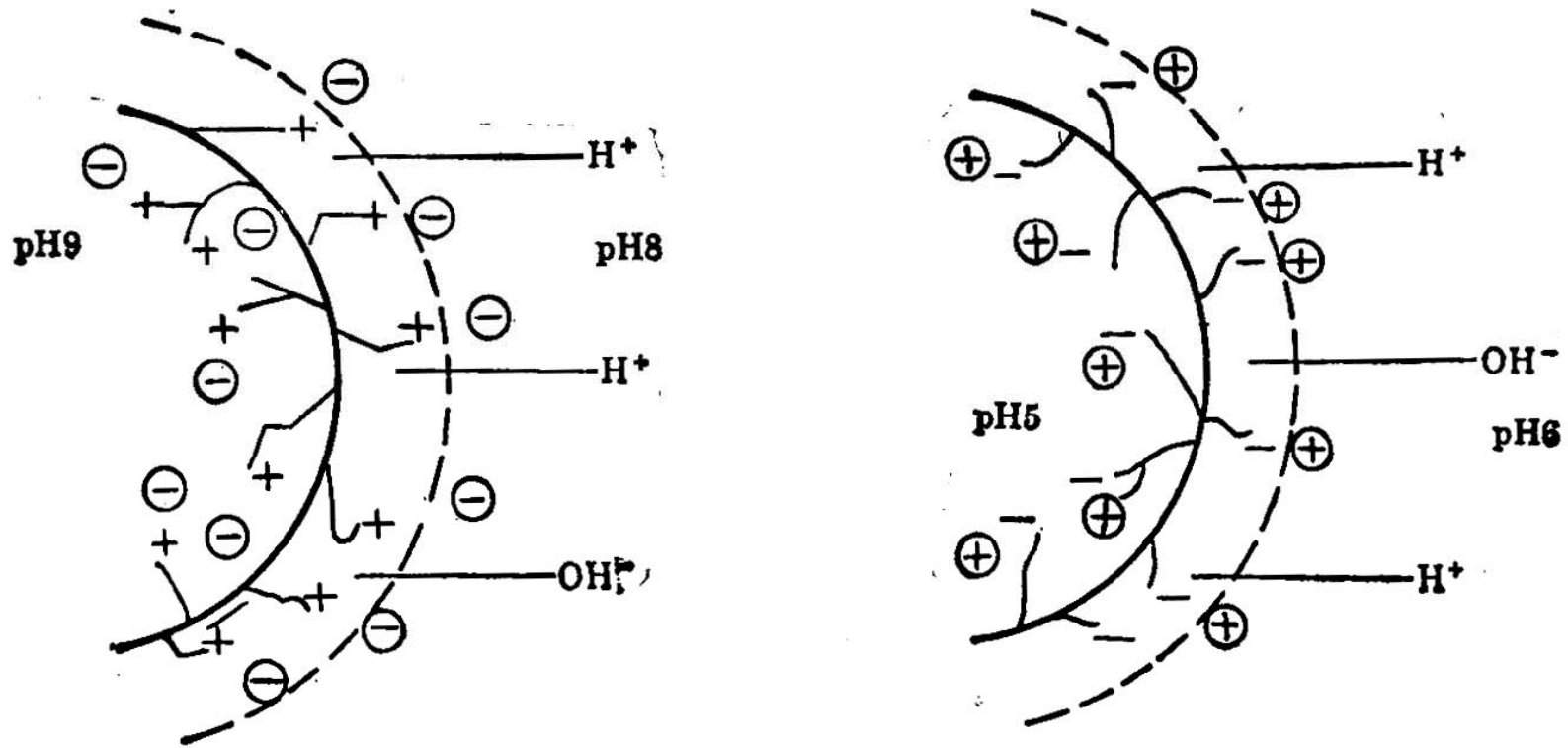


图 22-24 离子交换层析剂中 pH 的道南效应

层析分离法

■ 第五讲 染料亲和层析

- 活性染料常有蒽醌或萘衍生物, 含有一个或多个氨基或磺酸基。其结构类似某些酶的底物 (NAD 中 ADP—核酸的结构类似物)
- 特点:
 - (1) 蛋白结合容量大, 是天然配基的10—100倍
 - (2) 廉价易得。
 - (3) 具有普遍适用性。
 - (4) 配基的偶联方法简单, 易于操作, 可大规模应用。
 - (5) 染料的光谱特征可用来检测柱中染料浓度。



层析分离法

■ 第五讲

机理

- (1) NAD 中ADP—核酸的结构类似物
- (2) 离子交换（磺酸基，氨基）
- (3) 疏水作用（芳香基团）
- (4) 金属离子，染料和蛋白质之间形成三元

络合物



层析分离法

■ 第五讲

工艺条件

■ 吸附:

- (1) 低的PH时结合更为牢固
- (2) 配体浓度 调整染料配体的浓度可以改变纯化因子

■ 洗脱

- (1) 洗脱方式 : 可用脉冲、分段、梯度.
- (2) 洗脱剂的选择 : 磷酸盐、辅酶和核苷酸、底物、多元醇、表面活性剂及pH等



层析分离法

第五讲

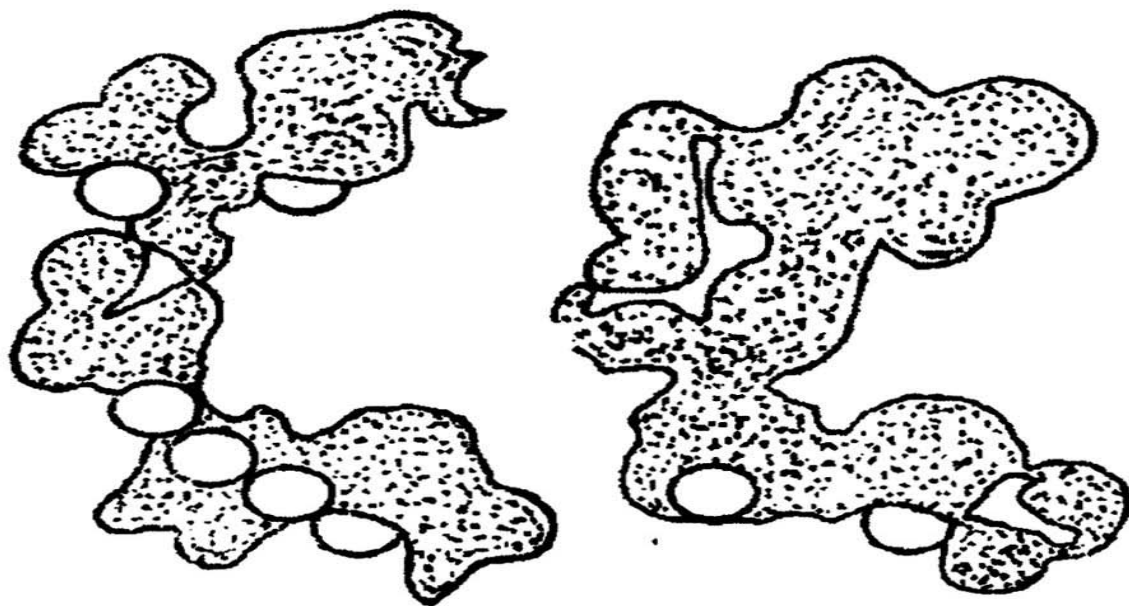


图 22-15 Cibacron Blue F3GA 和 NAD 之间的结构类似性

左边是 NAD 的模型， 右边是 Cibacron Blue F3GA 的模型

层析分离法

第五讲

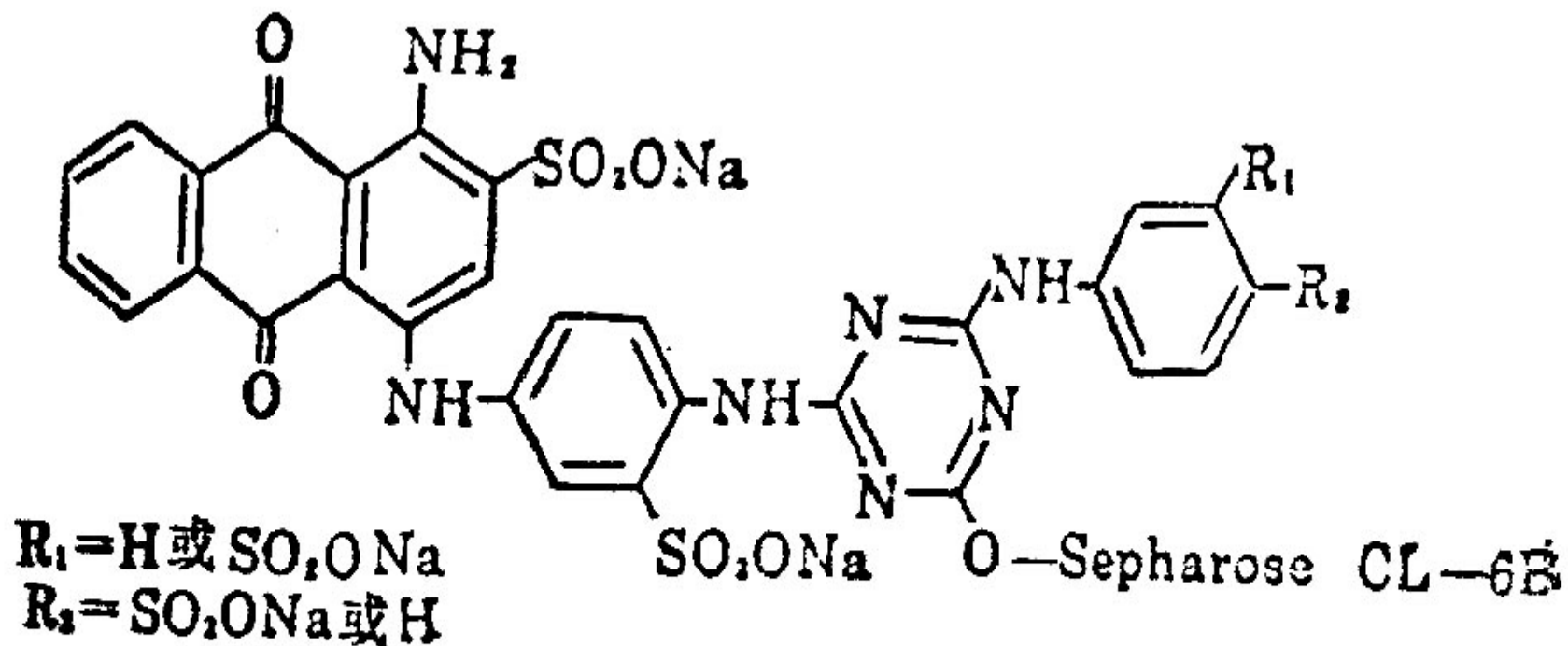


图 22-16 蓝色 Sepharose CL-6B 部分结构

层析分离法

■ 第五讲

应用

- 染料的选择
- Cibacron Blue F3G—A (CB) 染料可用来纯化NAD依赖的脱氢酶：
 - a核苷酸依赖的脱氢酶，
 - b· 各种激酶，包括水解酶，乙酰基转移酶，磷酸水解转移酶，RNA和DNA核酸酶和限制性核酸内切酶等，
 - c. 肌球蛋白，各种血蛋白及干扰素等。
- Procion Red HE—3B，适于纯化对NADP依赖的脱氢酶则更有亲和性



层析分离法

第五讲

药物研究

2001年第10卷第4期

重组人促红细胞生成素生产工艺研究

■ 吸附

Blue Sepharose 6 Fast Flow

- 20mM, PH 7.0 磷酸缓冲液
- 洗脱：含盐缓冲液、
- 洗脱液进一步用凝胶层析
- 回收率45%



层析分离法

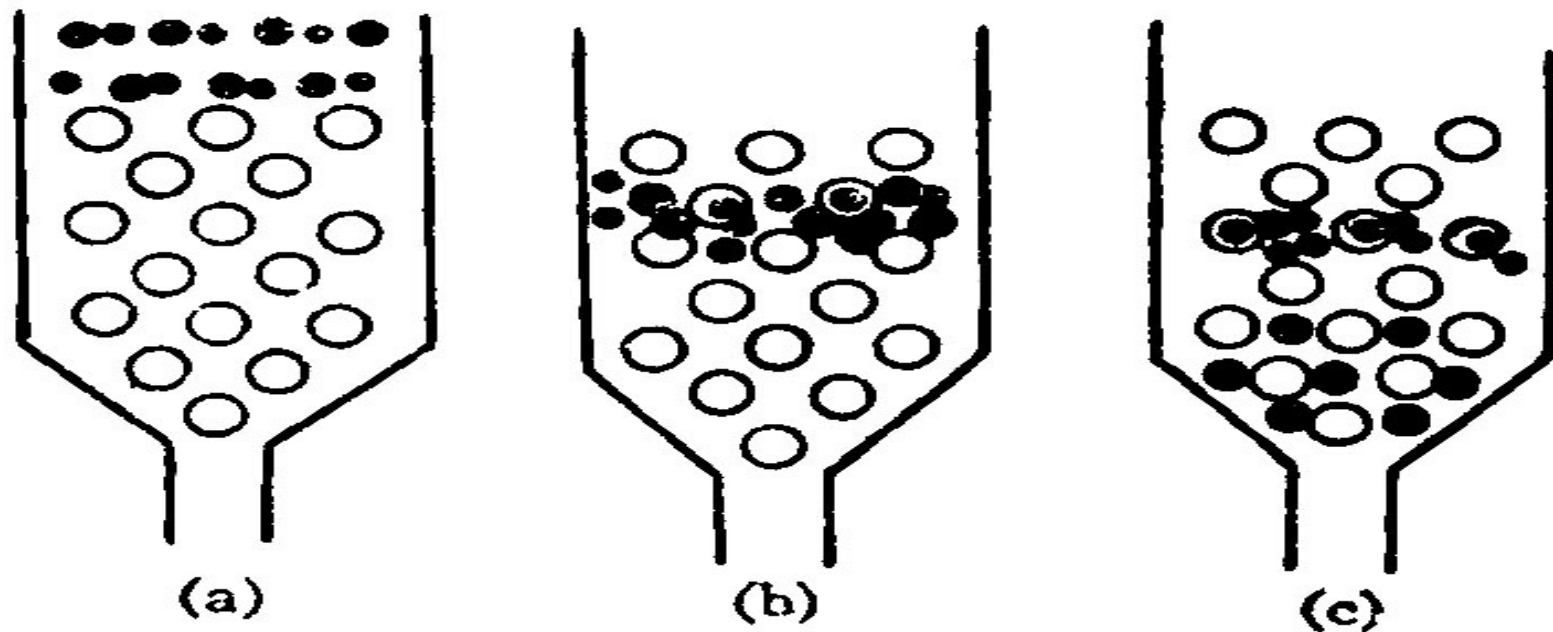
■ 第五讲 凝胶层析法 (Gel Filtration Chromatography)

- 又称凝胶排阻层析，分子筛层析法，凝胶过滤法等。 是根据溶质分子的大小进行分离的方法
- 特点：
 - (1) 操作方便, 不会使物质变性。
 - (2) 层析介质不需再生, 可反复使用
 - (3) 容量比较低
 - (4) 一般在最后的外理中被使用



层析分离法

分子筛

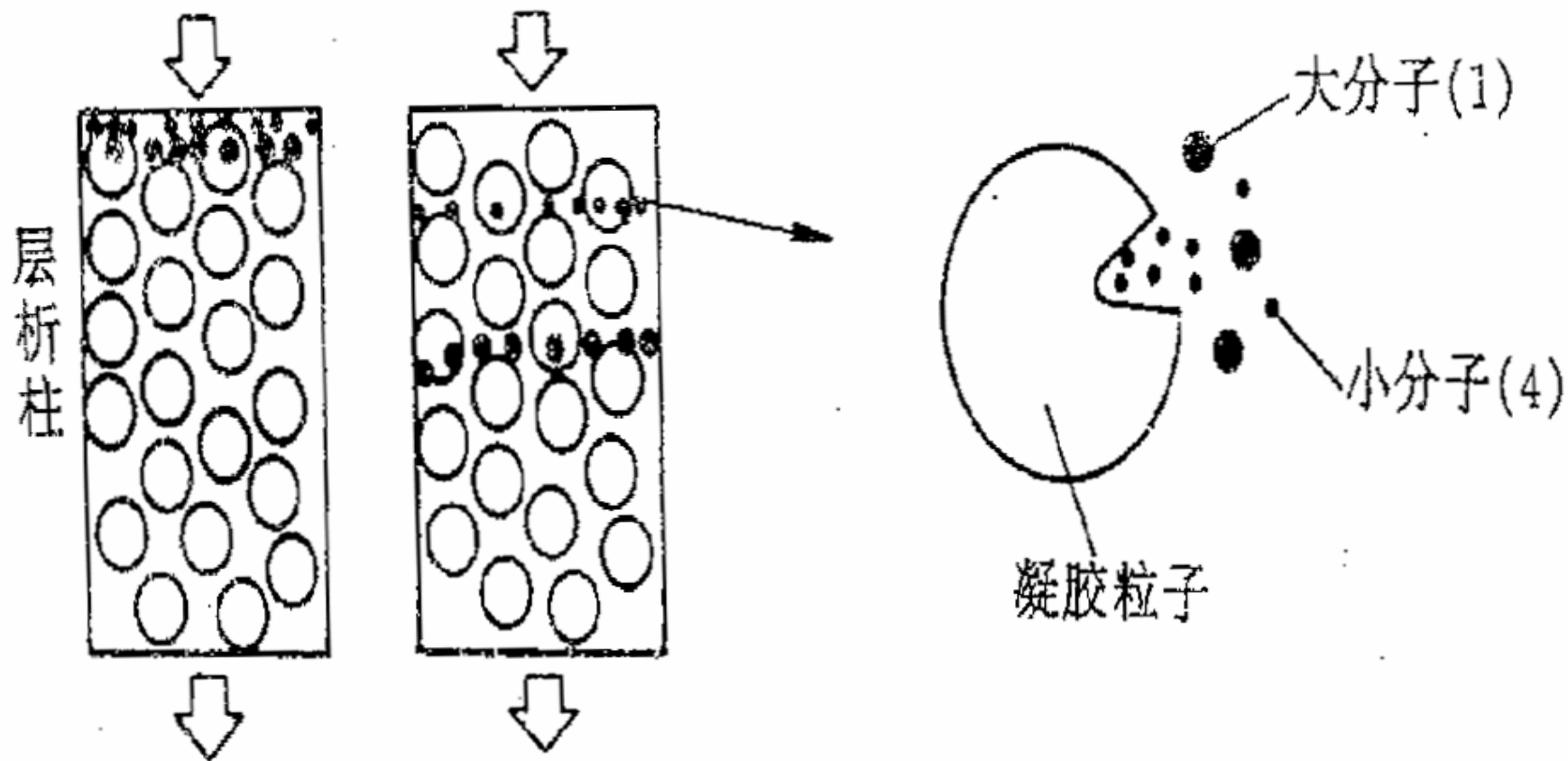


● — 大分子量溶质 ● — 小分子量溶质
○ — 凝胶颗粒

图 22-26 凝胶色谱法的原理

层析分离法

第二讲



a. 分离原理

层析分离法

■ 第五讲 葡聚糖凝胶 (Sephadex) 的理化性质

- (1) 排阻极限 (exclusion limit) 是指不能扩散到凝胶基质内部中去的最小分子的分子量
- (2) 分级范围 (Fractionation range) 它指出了当溶液通过凝胶柱时, 能够为介质阻滞并且分离的溶质分子量范围 (Sephadex G—50, 它的分级范围为 1500—30000)
- (3) 吸水量 (Water regains) 1g干凝胶所吸收的水分称为吸水量G-50的吸水量为 $5.0 \pm 0.3g$
- (4) 凝胶粒径 凝胶颗粒一般为球形 100-200目 (50-150 μm)
- (5) 床体积 (Bed volume) 表示1g干胶在溶胀后所



层析分离法

■ 第五讲 凝胶层析操作

- A 凝胶选择：
 - **选型**：脱盐： G-10, G-15, G25, 分级： G-50 , G-100, G-150
 - **粒度**：分粗(相当于50目), 中(100目), 细(200目), 极细(300目)四种粗, 中用于生产上层析, 细者用于科研
 - **溶胀**：干燥凝胶加水或缓冲液在烧杯浸泡吸水, 静置 , 筛选。



层析分离法

■ 第五讲

■ B 装柱

- (1) 柱长选择：细长柱，脱盐：柱高50cm； 分级：100cm。
- (2) 装柱：
- 均匀性：a 蓝色葡聚糖—T2000溶液过柱，观察色带均匀下降。a对光检查

■ C 加样

- (1) 除去不溶物
- (2) 样品浓度：浓度大些为好
- (3) 上样体积：分析1-2%床体积； 制备20-30%
- (4) 样品自然流进凝胶后，加洗脱液，防止返



层析分离法

■ 第五讲

■ D 洗脱

- (1) 洗脱液：洗脱液成份应与膨胀胶所用的液体相同
- (2) 操作压：Sephadex G-100, 2.4—9.4kPa, 而G-200凝胶则为0.4—0.6kPa。
- (3) 洗脱液分步收集

■ E 凝胶再生和保养

- (1) 多次使用后重新填装。
- (2) 短期不用, 加0.02%叠氮化钠(NaN_3)
- (3) 长期不用, 酒精浸泡脱水需然后60—80℃烘干。



层析分离法

■ 第五讲

应用

- (1) 脱盐
- (2) 分级分离
- (3) 分子量测定
- $\lg MW$ 与 V_e 成线性关系



层析分离法

■ 第五讲

思考题

- 1 苯硼酸亲和介质用于分离哪些目标物？原理是什么？
- 2 道南效应对离子交换树脂产生怎样的影响？
- 3 凝胶层析分离机理是什么？
- 4 染料亲和层析的分子机制是什么？



层析分离法

■ 第五讲

思考题：

- 1 理解概念：电泳迁移率，电渗，电泳，
■ SDS-PAGE ， 双向电泳，等电聚焦。
■ 毛细管电泳。
- 2 不连续电泳与连续电泳有何区别？
- 3 十二烷基硫酸钠（SDS）在SDS-聚丙烯
■ 酰胺电泳中起什么作用？



Thanks !

